



Universidad  
Católica de  
Valencia  
San Vicente Mártir

TFG

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN  
BIOTECNOLOGÍA

## Cultivo *in vitro* de un híbrido comercial de *Thymus piperella* L. (Lamiaceae).

Alumno: Roberto De Medinacelli Juan Méndez

Tutor: Jorge Juan Vicedo

4º Biotecnología



Facultad de Veterinaria  
y Ciencias Experimentales  
Universidad Católica de Valencia  
San Vicente Mártir



## **Agradecimientos**

A Roberto y Salvadora, mis padres. Nada de esto hubiera sido posible sin el sacrificio, apoyo y esfuerzo que han mostrado durante toda mi vida.

A D. Jorge Juan Vicedo. Por su dedicación, esfuerzo constante, ayudarme a que este estudio se llevará a cabo y la pasión con la que me ha transmitido sus conocimientos.

A Dña. Carmen Fagoaga. Por saber inculcarme la pasión que muestra por el reino vegetal y por todo lo que me ha enseñado en las materias cursadas de este sector.

A Esther Asensio del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza, por la realización de los análisis químicos de este estudio.

A mis familiares y amigos por su apoyo durante estos años.

A la Universidad Católica de Valencia (Sede Santa Úrsula), al igual que a cada uno sus docentes y trabajadores por ayudarme durante todos estos años.



## **Índice de figuras**

<b>Figura 1:</b> Comparativa de <i>Thymus piperella</i> L. respecto a otras especies de <i>Thymus</i> donde se ilustra la hoja por el haz y el envés .....	2
<b>Figura 2:</b> Representación de la planta y hojas de <i>Thymus piperella</i> L .....	3
<b>Figura 3:</b> Mapa de la distribución de <i>Thymus piperella</i> en la península ibérica .....	4
<b>Figura 4:</b> Esquema de las técnicas de organogénesis directa e indirecta .....	6
<b>Figura 5:</b> Esquema ilustrativo de las diferentes etapas de las que se compone la técnica de micropropagación .....	7
<b>Figura 6:</b> Esquema de organogénesis directa .....	8
<b>Figura 7:</b> Esquema de la técnica de organogénesis indirecta .....	11
<b>Figura 8:</b> ilustración de “ <i>Browning oxidation</i> ” .....	12
<b>Figura 9:</b> Estructura química del ácido-3-indolacético (AIA) .....	13
<b>Figura 10:</b> Estructura química de las citoquininas BAP y 2iP .....	14
<b>Figura 11:</b> Imagen de la especie y las hojas de <i>Thymus piperella</i> L. ....	17
<b>Figura 12:</b> Imagen del proceso de esterilización .....	18
<b>Figura 13:</b> Imagen del pHímetro con el que se realizó la medición del pH .....	19
<b>Figura 14:</b> Ilustración de la escisión del explante para el subcultivo y batería de los tratamientos con explantes cultivados .....	20
<b>Figura 15:</b> Medición del peso de los explantes para el posterior análisis de los compuestos químicos .....	23
<b>Figura 16:</b> Etiolación de los explantes tras los 10 días en oscuridad .....	25

<b>Figura 17:</b> Ilustración de la contaminación producida durante el cultivo .....	29
<b>Figura 18:</b> Necrosis de los explantes durante el experimento .....	31
<b>Figura 19:</b> Callo generado durante el experimento de multiplicación .....	32
<b>Figura 20:</b> Ilustración de los explantes en base a algunos tratamientos aplicados ....	34
<b>Figura 21:</b> Cromatograma de los compuestos químicos analizados .....	37

## **Índice de tablas**

<b>Tabla 1:</b> Reguladores del crecimiento empleados en los experimentos de multiplicación de <i>Thymus piperella</i> L. ....	21
<b>Tabla 2:</b> Resultados de los 10 primeros días tras el inicio .....	24
<b>Tabla 3:</b> Resultados tras los 20 días de inicio .....	26
<b>Tabla 4:</b> Resultados del experimento de multiplicación tras 10 días .....	28
<b>Tabla 5:</b> Resultados del experimento de multiplicación tras 20 días .....	30
<b>Tabla 6:</b> Resultados del experimento de multiplicación tras 30 días .....	33
<b>Tabla 7:</b> Resultados de las 3 mediciones del peso seco de la especie .....	35
<b>Tabla 8:</b> Resultados del análisis fitoquímico de la planta <i>wild type</i> y los tratamientos seleccionados .....	36





### **Listado de abreviaturas**

**(2,4-D):** ácido 2,4-Diclorofenoxiacético

**(2iP):** 2-isopentenyladenina

**(4-Cl-AIA):** ácido 4-cloro-indolacético

**(IAA):** Ácido indol-3-acético

**(AIB):** ácido indol-3-butírico (IBA)

**(AIP):** ácido indol propiónico

**(ANA):**  $\alpha$ -naftalenacético

**(APA):** ácido fenilacético

**(BAP):** 6-Bencilaminopurina

**(GC/MS):** Gas chromatography–mass spectrometry

**(HCL):** Ácido clorhídrico

**(HK):** Histidina quinasa

**(HPLC):** Cromatografía líquida de alta presión

**(HS):** Headspace

**(L):** Litros

**(LSD):** Least significant difference

**(Mg):** Miligramos

**(MP):** Membrana plasmática

**(MS):** Murashige & Skoog médium

**(NaOH):** Hidróxido de sodio

**(p-ACF):** para-clorofenoxiacético

**(RE):** Retículo endoplasmático

**(SPME):** Solid phase microextraction

**(Th):** Thymus

**(Trp):** Triptófano

## **Resumen**

Las especies del género *Thymus* L. (Lamiaceae) presentan un gran interés como plantas medicinales, condimentarias y de extractos, con múltiples aplicaciones actuales y potenciales debido a la alta riqueza en metabolitos secundarios bioactivos que producen. Concretamente, especies como *Thymus piperella* L., prácticamente endémica de la Comunidad Valenciana, tienen un amplio abanico de usos tradicionales en este sentido. Aunque se ha estudiado la micropropagación de esta especie y se conoce la composición en compuestos volátiles en tres quimiotipos silvestres descritos dentro de su área de distribución, todavía no se ha estudiado si las condiciones de cultivo *in vitro* pueden afectar a la producción de estos metabolitos en esta especie o en sus híbridos comerciales de uso tradicional. Por ello, el principal objetivo de este trabajo fue desarrollar un protocolo de micropropagación de un híbrido comercial de uso popular de *Th. piperella*. Los resultados obtenidos mostraron una buena capacidad de adaptación e inicio del cultivo *in vitro* tras los dos tratamientos de esterilización aplicados. Además, los distintos parámetros de desarrollo vegetal medidos en la fase de multiplicación mostraron valores significativamente mayores en medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con 0,013 mg/l de 2-isopenteniladenina (2iP), o sin reguladores del crecimiento, y 30 g/l de sacarosa y solidificado con 5,5 g/l de Plant Agar tras compararlos con los otros tratamientos. Finalmente, la prueba realizada acerca del contenido en compuestos volátiles mediante SPME-GC/MS-HS reveló que se produjo un aumento destacable de timol en las plantas cultivadas *in vitro* en comparación con las muestras procedentes de planta silvestre. Por todo ello, los resultados obtenidos en el presente trabajo podrían suponer la base para el desarrollo de futuros estudios acerca de la elicitación de este compuesto mediante sistemas de cultivo *in vitro* con material vegetal de *Th. piperella* o de sus híbridos comerciales.

**Palabras clave:** *cultivo in vitro*, *organogénesis*, *micropropagación*, *Thymus piperella*, *2iP*.

## **Abstract**

Species of the genus *Thymus* L. (Lamiaceae) are of great interest as medicinal plants, seasoning and extracts with multiple current and potential applications due to the high richness of the bioactive secondary metabolites they produce. Specifically, species such as *Th. piperella* L., practically endemic to the Valencian Community, have a wide range of traditional uses in this sense. Although the micropropagation of this species has been studied and the composition of volatile compounds in three chemotypes described within its distribution area is known, it has not yet been studied how in vitro culture conditions can affect the production of these metabolites in *Th. piperella* or in its commercial hybrids of traditional use. Therefore, the main objective of this work was to develop a micropropagation protocol of a popularly used commercial hybrid of *Th. piperella*. The results obtained showed a good capacity of adaptation and initiation of in vitro culture after the two sterilization treatments applied. In addition, the different plant development parameters measured in the multiplication phase showed significantly higher values in Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 0.013 mg/l 2-isopentenyladenine (2iP), or without plant growth regulators, plus 30 g/l sucrose and solidified with 5.5 g/l Plant Agar when compared to the other treatments. Finally, the test performed on the content of volatile compounds by SPME-GC/MS-HS revealed that there was a remarkable increase of thymol in the in vitro cultivated plants compared to the samples from wild plant. Therefore, the results obtained in the present work could be the basis for the development of future studies on the elicitation of this compound by in vitro culture systems with plant material of *Th. piperella* or its commercial hybrids.

**Key words:** *in vitro culture, organogenesis, micropropagation, Thymus piperella, 2iP, BAP, IAA.*

## Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1    Género <i>Thymus</i> L.....	1
1.2 <i>Thymus piperella</i> L. ....	2
1.2.1    Origen y distribución .....	3
1.2.2    Usos tradicionales .....	4
1.2.3    Potenciales aplicaciones de <i>Thymus piperella</i> .....	5
1.3    Técnicas de cultivo <i>in vitro</i> .....	5
1.3.1    Organogénesis directa.....	6
1.3.2    Organogénesis indirecta.....	10
1.4    Reguladores del crecimiento empleados en cultivo <i>in vitro</i> .....	12
1.4.1    Auxinas.....	12
1.4.2    Citoquininas.....	13
2. OBJETIVOS .....	16
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	17
3.1    Material Vegetal.....	17
3.1    Esterilización e inicio del cultivo <i>in vitro</i> .....	17
3.2    Multiplicación del cultivo <i>in vitro</i> .....	19
3.3    Monitorización del desarrollo vegetal en la fase de inicio.....	21
3.4    Monitorización y toma de datos de la multiplicación.....	22
3.5    Tratamiento estadístico de los datos obtenidos .....	22
3.6    Caracterización química preliminar de los compuestos volátiles presentes en material vegetal en cultivo <i>in vitro</i> de <i>Th. piperella</i> . ....	22
4. RESULTADOS .....	24
4.1    Esterilización e inicio .....	24
4.2    Multiplicación de <i>Th. piperella</i> .....	26
4.3    Caracterización química preliminar de los compuestos volátiles presentes en material vegetal en cultivo <i>in vitro</i> de <i>Th. piperella</i> . ....	35
5. DISCUSIÓN.....	38
6. CONCLUSIONES .....	43
7. BIBLIOGRAFÍA Y WEBGRAFÍA .....	44



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Género *Thymus* L.

El género *Thymus* L. está representado por un total de 220 especies en el mundo (Khajuria, Bisht, y Bhagat, 2020) y 36 subespecies (Kosakowska et al., 2020). Posee una elevada riqueza taxonómica en el Mediterráneo, especialmente en la Península Ibérica, donde sólo en la Comunidad Valenciana y la Región de Murcia se han descrito más de 40 taxones (Rivera, Alcaraz, Verde, Fajardo, y Obón, 2008; Mateo y Crespo, 2014; Ferrer-Gallego, Peris, Rovira, y Lumbreras, 2019). Presenta numerosas especies aromáticas de interés medicinal, como planta productora de aceites esenciales, especias e incluso ornamental, empleados tradicionalmente en las zonas más rurales, o en el plano industrial donde se han llevado a cabo programas de mejora basados en la obtención de triploides (Shmeit et al., 2020). Pertenecen a este género plantas muy conocidas y utilizadas popularmente como el tomillo (*Th. vulgaris* L.), el cantueso (*Th. moroderi* Pau ex Martínez), la mejorana o tomillo blanco (*Th. mastichina* (L.)), el tomillo salsero (*Th. zygis* L.) o la pebrella (*Th. piperella* L.).

Además, se han descrito numerosos híbridos entre las distintas especies del género *Thymus* L. entre los cuales, los parentales más frecuentes son *Th. vulgaris* y *Th. piperella* (Castroviejo, 1986-2012; Mateo y Crespo, 2014). Por ejemplo, *Thymus x josephi-angeli* J. Mansanet y A. Aguilera = *Th. piperella* L. x *Th. vulgaris* L. (Figura 1), resultado del cruce entre *Th. piperella* x *Th. vulgaris* (Mansanet, Mateu, Mansanet, Aguilera, y Maten, 1985). Ambas especies son muy utilizadas popularmente en el área donde se distribuyen por sus propiedades (Guesmi, Saidi, y Landoulsi, 2020) por lo que no es de extrañar que algunos de ellos se hayan conseguido domesticar y producir en vivero con la intención de ser aprovechados localmente como planta medicinal y condimentaria (Morales, Tardío, Aceituno, Molina, y Pardo-De-Santayana, 2011). Una de las razones por la que se distingue *Th. vulgaris* de *Th. piperella* L., es el tipo de hoja, ya que el primero posee hojas estrechas y revolutas (hojas curvadas hacia el envés), mientras que la pebrella tiene hojas anchas, con forma oval o elíptica y de margen plano o casi plano (Mateo y Crespo, 2014).

Otra variedad de híbrido documentado es *Thymus x royo* P. P Ferrer, A. Navarro, Pérez y E. Laguna. Resultado entre el entrecruzamiento natural de *Th. vulgaris* y *Th. willkommii* Ronniger (Ferrer-Gallego et al., 2019).

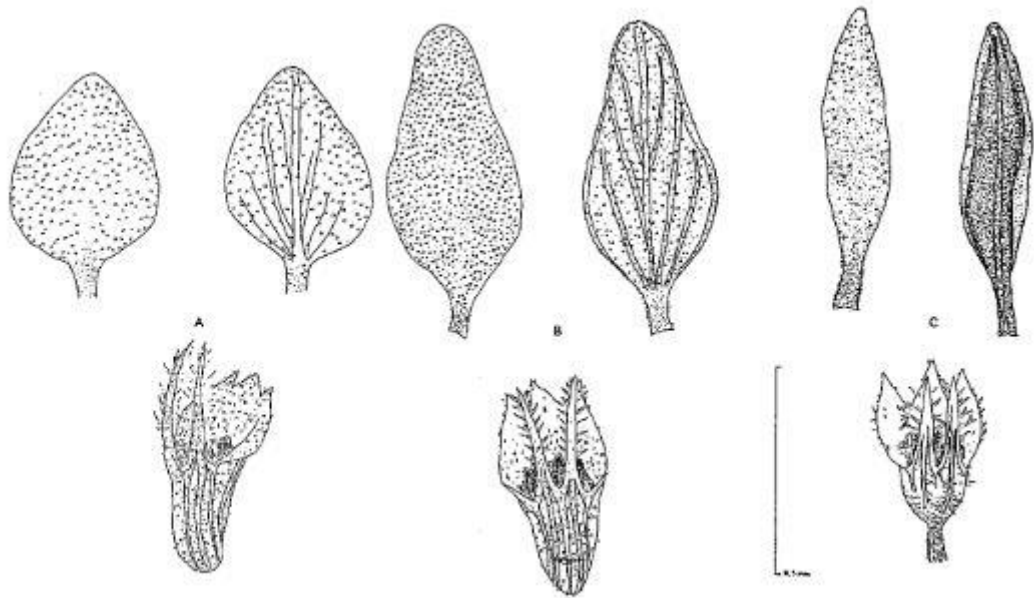


Figura 1: Hojas y cálices ilustradas de *Thymus piperella* L (A). (*Th. x josephi angeli*) J. Mansanet y A. Aguilera (B) y *Th. vulgaris* L. (C). Fuente: Mansanet et al., 1985

### 1.2 *Thymus piperella* L.

Es una planta erguida que alcanza una altura máxima de 30 cm (Figura 2), con un crecimiento irregular y ramificado desde la base, con ramas erectas y tomentosas, leñosa, presenta tallos holótricos (cubierto de cilios o pelos) y tallos laterales generalmente sin ramificar, pubescentes, pueden presentar pelillos cortos y con una sección de forma cuadrangular. Las hojas presentan un área de 5-6 x 3-4 mm (Figura 2), son de morfología obovadas o elíptica, planas, glabras y sin cilios en la base. También posee una nerviación conocida como camptódroma o en el envés, posee unos nervios que pueden desaparecer en la parte apical. (Adzet y Passet, 1976).



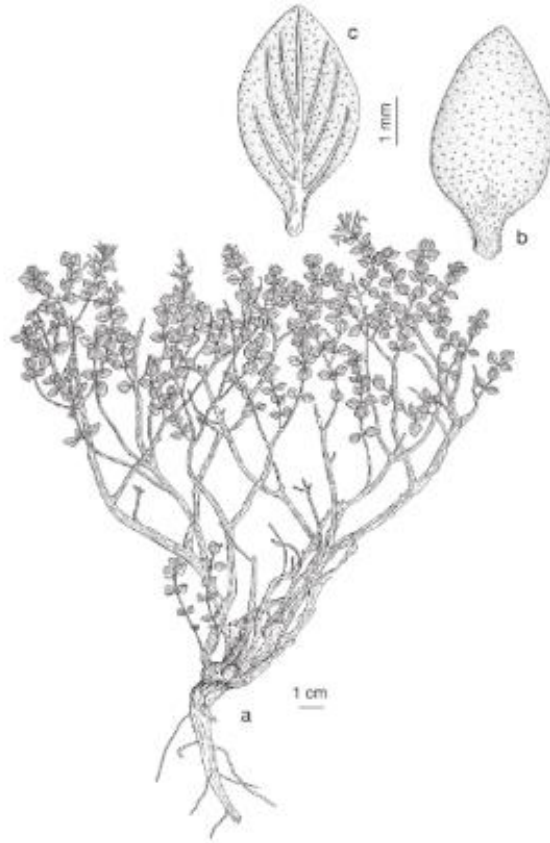


Figura 2: Planta de *Thymus piperella* L. (a), haz de la hoja de *Thymus piperella* L. ;(b) y envés de la hoja de *Thymus piperella* L.; (c). Fuente: Lám. 108.—*Thymus piperella*, a-c) Buñol, Valencia (MA 312478) Castillo '97. (Morales, 1994)

### 1.2.1 Origen y distribución

La pebrella es una especie endémica que se encuentra distribuida prácticamente en la Comunidad Valenciana, penetrando ligeramente en la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia y en Castilla-La Mancha (Sáez, Sánchez, y Piqueras, 1994). La mayor parte de las poblaciones de esta especie se concentran en las comarcas centrales de la Comunidad Valenciana, sierras de Mariola (Belda, Zaragoza, Belda, Martínez y Sev, 2013), Biar, Font roja y Villena. En Valencia y Castellón, también se puede localizar (<https://www.gbif.org/species/8354272>) (Figura 3). En la Región de Murcia se ha citado en la Sierra del príncipe, Portillo, Altos de Caudete (Yecla) y Cerros de Yecla y también incluso en Castilla-La Mancha, donde llega a los municipios albacetenses de Almansa y Alatoz (Morales, 1995). Pese a que en la Comunidad Valenciana suele ser una planta abundante en determinados matorrales bajos de montaña (Mateo y Crespo 2014), la abundancia en Murcia y Albacete suele ser menor, quedando restringida a las sierras más septentrionales limitada a hábitat de matorrales y pastizales (Lumbreras y Ferrer-gallego, 2018).

Se ha documentado que en la comarca del Altiplano (Jumilla-Yecla, Murcia) se ha producido un enorme descenso poblacional de esta especie, ya que hay una escasez de agua considerable debido al aumento de las temperaturas medias y las sequias en los últimos años. Estas condiciones son un gran inconveniente para esta especie, ya que necesite gran cantidad de agua en el período tardo-estival, por lo que requiere fomentarse su cultivo controlado en viveros (<http://www.floraprotegida.es/flora-vulnerable.php/Thymus-piperella-123/>).



Figura 3: Mapa de distribución de *Thymus piperella* L. en la península Ibérica. Fuente: Global Biodiversity Information Facility, GBIF (<https://www.gbif.org/species/8354272>)

### 1.2.2 Usos tradicionales

La pebrella se ha utilizado tradicionalmente en la Comunidad Valenciana como condimento por su fuerte olor y sabor para acompañar el asado de carne junto al romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y orégano (*Origanum vulgare* L.). En medicina tradicional se ha utilizado sobre todo para tratar la congestión y como bebida digestiva ya que aumenta la secreción gástrica por vía reflejo favoreciendo de esa forma la digestión. La dosis ideal se encuentra en una proporción del 2-3% (Gisbert, 2013). En la elaboración de perfumes también fue utilizada ya que es una planta con alta cantidad de fenoles terpénicos, monoterpenos, flavonas y favanonas que explicarían el fuerte olor que desprende (Morales et al., 2011; Gisbert, 2013). También es utilizada contra las inflamaciones (Rivera et al., 2008).

### 1.2.3 Potenciales aplicaciones de *Thymus piperella*

Las potenciales aplicaciones de *Th. piperella* son variadas. Bien es sabido que las plantas medicinales o aromáticas tienen gran interés por los metabolitos secundarios que producen (Leal et al., 2017). Se han descrito alrededor de 48 compuestos químicos presentes en el aceite esencial de *Th. piperella* y representan el 90,5% del contenido en aceite esencial de esta especie (Costa, 2016). Debido a su riqueza en compuestos orgánicos volátiles, a los que se les ha atribuido su actividad antioxidante, antifúngica, antibacteriana, entre muchas otras (Costa, 2016). En función de los compuestos dominantes, se han descrito tres quimiotipos distintos para *Th. piperella* (Ruiz-Navaja, Viuda-Martos, Sendra, Perez-Alvarez, y Fernández-López, 2012). Según estos autores, los componentes mayoritarios para el quimiotipo A fueron *para-cimeno*, *carvacrol* y  $\gamma$ -*terpineno*. El quimiotipo B se compone fundamentalmente de *para-cimeno* y *timol* y el quimiotipo C presenta una composición dominante de *para-cimeno* y *carvacrol*.

En la industria alimentaria se ha empezado a utilizar para la mejora en la conservación y aumento de la vida útil del jamón curado en efecto conjunto con quitosano (Ruiz-Navajas et al., 2015).

Se han realizado experimentos para evaluar la capacidad antimicrobiana y antioxidante de una película alimentaria comestible a base de aceites esenciales de *Th. piperella* y *Th. moroderi* (Ruiz-Navajas, Viuda-Martos, Sendra, Perez-Alvarez, y Fernández-López, 2013) y se observó que fueron más efectivas ( $p < 0.05$ ) contra las bacterias *Serratia marcescens* y *Listeria innocua* frente a las películas de quitosano empleadas como control que contienen aceites esenciales que contiene *Th. moroderi*. Tienen propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales y antioxidantes destacables. (Costa, 2016; Labib y Aldawsari, 2015; Leal et al., 2017; Ruiz-Navajas et al., 2013).

### 1.3 Técnicas de cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales involucra una serie de técnicas (Figura 4) que implican el manejo del material vegetal en condiciones de esterilidad, cultivo y crecimiento en condiciones controladas de temperatura, fotoperíodo e intensidad lumínica (fundamentalmente) así como de nutrientes y otros suplementos en el medio de cultivo, incluyendo reguladores del crecimiento (Sant Saran Bhojwani y Prem Kumar Dantu, 2013; Alkowni, Esra y Qaoud 2017).

La contribución más significativa del cultivo *in vitro* es la capacidad de las células vegetales para la regeneración de nuevos tejidos y órganos, y dar lugar así a plantas completas tanto por organogénesis directa como indirecta gracias al fenómeno de totipotencia que presenta la célula vegetal (Pasternak, Lystvan, Betekhtin, y Hasterok, 2020; Singh y Singh, 2021). Por ello, las técnicas de cultivo *in vitro* constituyen en su conjunto una herramienta muy importante para la propagación clonal masiva de genotipos o cultivares élite, rescate de embriones híbridos, eliminación de virus, conservación de germoplasma y mejora vegetal con múltiples aplicaciones en agricultura, farmacología y conservación de especies raras, endémicas o amenazadas (Sharma, Sharma, Jain, Arora, Rai y Purshottam, 2016). En función de la vía morfogénica para la regeneración de plantas, se pueden dividir las técnicas de cultivo *in vitro* en dos grandes grupos: la organogénesis directa y la indirecta.

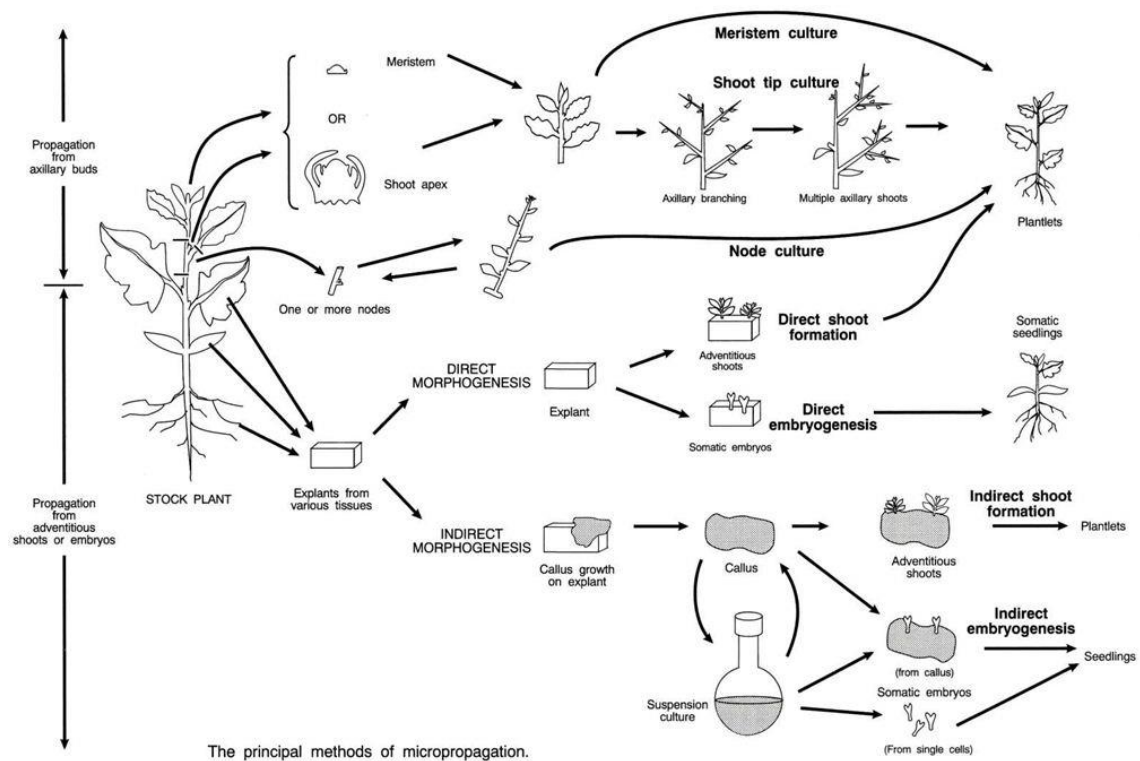


Figura 4: Esquema de organogénesis directa (superior) y organogénesis indirecta. Fuente: Universitat de Lleida. Autor: Gautheret

### 1.3.1 Organogénesis directa

La organogenesis directa (Figura 5) es la obtención de plantas generadas *in vitro* altamente conservadas genéticamente y con características vegetativas idénticas a la planta madre (Bekheet, 2013; Kane, 2011).

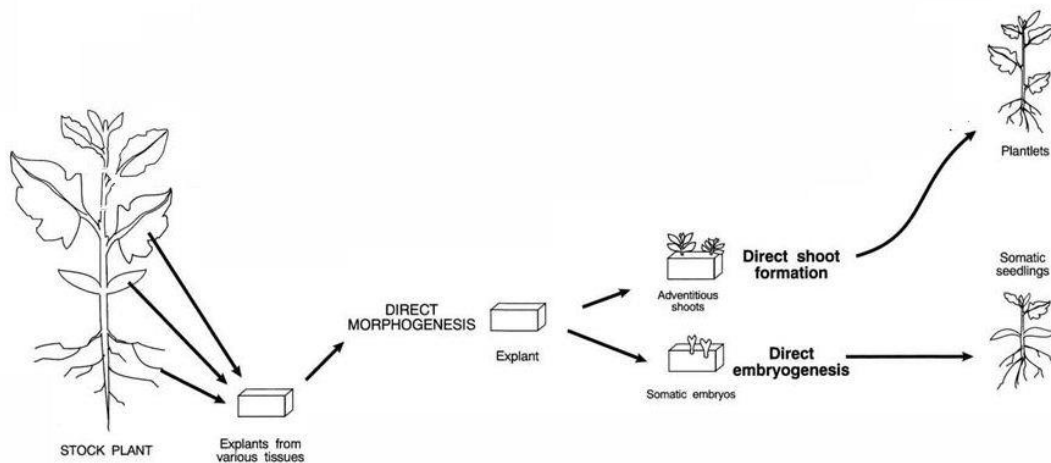


Figura 5: Esquema de la organogénesis directa y las dos técnicas implicadas. formación directa de brotes (superior) y embriogénesis directa (inferior). Fuente: Universitat de Lleida.

La técnica de micropropagación se define como un tipo de organogénesis directa en la que un genotipo establecido es seleccionado y propagado (multiplicado) asexualmente a través de la de regeneración de yemas vegetativas de las plantas madre, con la consecuente obtención de clones supuestamente uniformes (Bhojwani y Dantu, 2013). Así, dependiendo de la especie seleccionada y las condiciones de cultivo se puede lograr mediante: 1. brotes axilares; 2. formación de novo de brotes adventicios; 3. cultivo de nodos; 4. embriogénesis no cigótica (Kane, 2011).

Generalmente, la micropropagación se puede dividir en 4 etapas distintas (Bekheet, 2013; Bhojwani y Dantu, 2013; Shahzad et al., 2017; Kane, 2011) (Figura 6 ) tal y como se expone a continuación:

- **Etapla 0:** Esterilización del material vegetal: es la etapa en la que se seleccionan explantes de calidad de la planta madre (en cuanto al estado higiénico y/o fisiológico de la misma) y se someten a diferentes tratamientos para su posterior adaptación a las condiciones de cultivo *in vitro*. La contaminación en esta etapa es uno de los grandes problemas.
- **Etapla 1:** Inicio del cultivo *in vitro*: el objetivo de esta etapa es el establecimiento cultivos axénicos de la planta, capaces de restaurar el crecimiento, para ser posteriormente multiplicados *in vitro*.

- Etapa 2: Multiplicación y elongación: esencial para el éxito del protocolo de micropropagación ya que permite alcanzar aumentos teóricamente exponenciales de material producido *in vitro* en condiciones óptimas de cultivo.
- Etapa 3: Enraizamiento: esta etapa puede desarrollarse de forma simultánea a la multiplicación o, en algunos casos, a la aclimatación (etapa 4). Esta fase es fundamental porque asegura el éxito de la transferencia de las plántulas a condiciones ambientales o de cultivo *ex vitro*.
- Etapa 4: Aclimatación: es la transferencia del material producido *in vitro* a las condiciones ambientales o *ex vitro*.

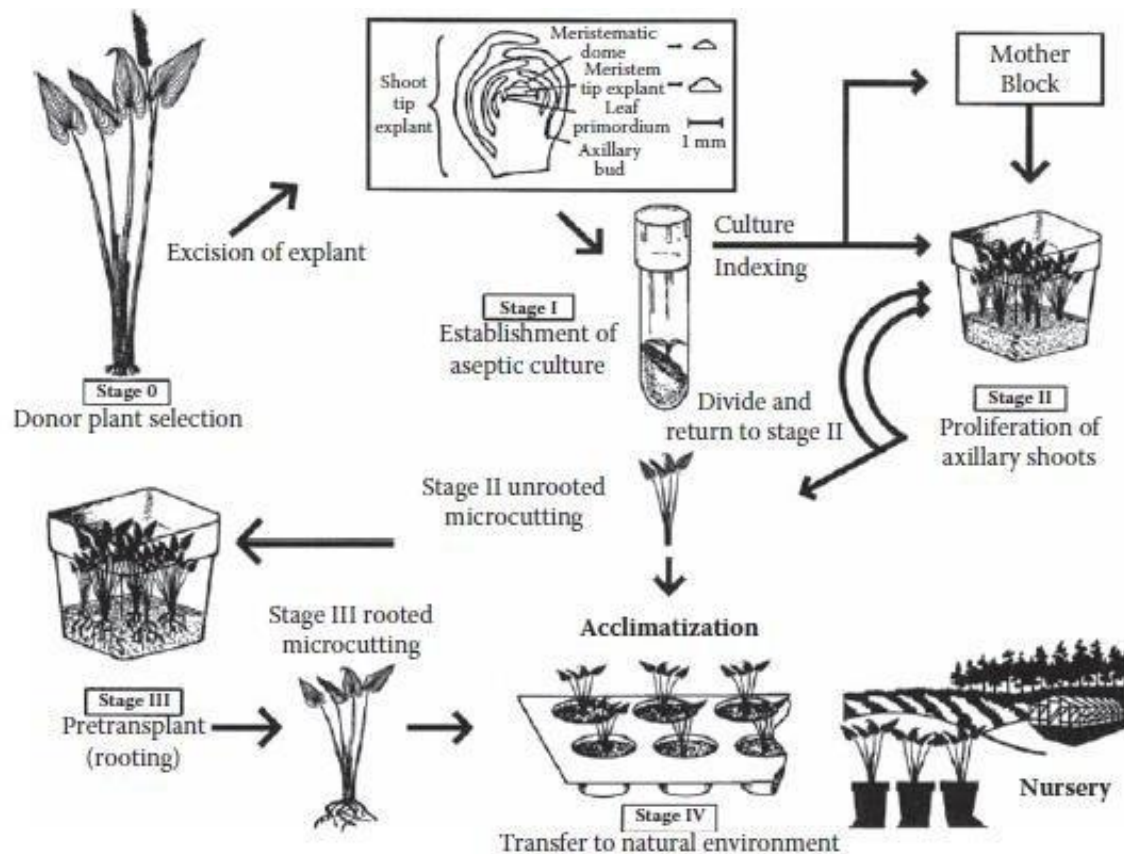


Figura 6: Esquema de las diferentes etapas principales de la micropropagación, desde la etapa 0 a la 4.  
Fuente: (Kane, 2011), página 183.

#### Ventajas de la organogénesis directa:

- Capacidad de obtener y albergar gran cantidad de clones en espacios reducidos. Esto ayuda la conservación de especies en peligro de extinción y a la

conservación de germoplasma (Gupta, Jain, Joseph, y Devi, 2020; Leal et al, 2017).

- Almacenar un gran número de stock de plantas de ciertas especies en peligro de extinción. (Gupta et al., 2020)
- El alto grado de conservación genética que se produce es útil para la producción de semillas. (Gupta et al., 2020)
- Facilidad en el transporte del material de un lugar a otro. (Villalobos y Thorpe, 1991).
- Obtener especies libres de virus y otros patógenos (bacterias, hongos, nematodos...) mediante el cultivo meristemos (Gupta et al., 2020).
- El almacenamiento de plantas propagadas *in vitro* durante largos periodos de tiempo y a bajas temperaturas (4°C), teniendo la capacidad de ser multiplicadas cuando se requiera (Bhojwani y Dantu, 2013).

#### Desventajas de la organogenesis directa:

- La contaminación es uno de los grandes problemas a lo largo de todo el proceso (Bhojwani y Dantu, 2013).
- La aclimatación al campo es un problema común que ocurre en el cultivo *in vitro*, la razón es que las plantas pueden sufrir estrés debido a la falta de pelos radicales o al cambio de humedad entre otras razones, y sufrir transpiración excesiva como consecuencia (Gupta et al., 2020).
- La hiperhidratación o vitrificación. Los explantes que son cultivados en ambientes con altas condiciones de humedad pueden presentar anomalías en aspectos anatómicos, morfológicos, fisiológicos y metabólicos (Kharrazi Tehranifar, Nemat, Bagheri, y Sharifi Sharif Abad, 2011; Bhojwani y Dantu, 2013).
- En el cultivo *in vitro* se puede dar el caso de que el medio adquiera un color marrón, en inglés adquiere el término “*Oxidative Browning*” (Figura 8). Los

explantos e vuelven marrones y/o necróticos y en ocasiones genera un color marrón en el medio, puede causar la muerte de los explantes (Bhojwani y Dantu, 2013; Woldeyes, Senbeta, Adugna, y Abegaz, 2021).

- La selección del medio de cultivo o reguladores del crecimiento es un inconveniente si no se conoce un protocolo de micropropagación óptimo para la especie sometida a estudio. (Bhojwani y Dantu, 2013; Shahzad et al., 2017).
- El coste. Generalmente, las especies micropropagadas requieren un coste mayor que las especies propagadas con otros métodos tradicionales debido a que el proceso de micropropagación es muy intensivo (Bhojwani y Dantu, 2013)

### **1.3.2 Organogénesis indirecta**

La organogénesis indirecta (Figura 7) es una técnica de cultivo en la que el explante pasa por una fase de dediferenciación celular para así formar lo que se conoce como callo, (Haberlandt, 1902). A continuación, puede pasar por una fase de rediferenciación debido a que las células del callo mantienen el fenómeno de totipotencia celular o se puede mantener y multiplicar el callo de forma permanente (Liu, Fu, Li, y Li, 2021; Tamini y Othman, 2021). Los primeros en establecer un cultivo indefinido de callos fueron Gautheret, (1939); Nobécourt, (1939); White, (1939).

Cabe destacar que la organogénesis indirecta suele provocar mutaciones espontaneas, incrementando así la variedad somaclonal y causar así más variabilidad genética entre especies (Ramírez-Mosqueda y Iglesias-Andreu, 2015). Esto ocurre ya que las plantas micropropagadas mediante la vía morfogénica indirecta sufren una adaptación celular en las condiciones del cultivo *in vitro* sufriendo cambios epigenéticos o incluso genéticos (Kaepler, Kaepler, y Rhee, 2000).



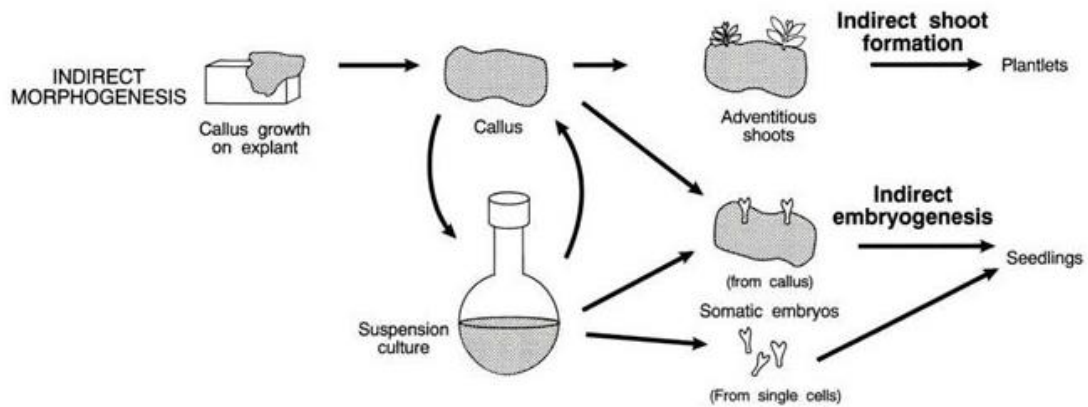


Figura 7: Esquema de la organogénesis indirecta y las dos técnicas involucradas en ella. la formación indirecta de brotes (superior) y la embriogénesis indirecta (inferior). Fuente. Universitat de Lleida.

### **Ventajas:**

- En la actualidad, se puede realizar transformación genética en especies vegetales mediante la formación de callo y mediado por *Agrobacterium spp.* involucrando técnicas como la biobalística (Malik et al., 2021).
- La variación somaclonal también puede causar variabilidad genética estable y beneficiosa mediante mutaciones puntuales, metilación del DNA, reordenamientos cromosómicos siendo transmisibles (epigenética) o no transmisibles a la descendencia. El tipo del explante o la edad del mismo tienen que ver en la generación de variación somaclonal (Saravanan et al., 2011; Veilleux y Johnson, 1998).
- Se pueden obtener grandes cantidades de compuesto bioactivos y metabolitos secundarios mediante el cultivo de callos, cultivos en suspensión y de órganos (Dogan, 2019; Shahzad et al., 2017).

### **Desventajas:**

- No es preferible para la propagación de plantas fieles al genotipo ya que puede conducir a la generación de variación somaclonal entre las plantas generadas *in vitro* (Verma, Zinta, y Kanwar, 2021).
- La alta tasa de contaminación es un gran problema, al igual que en la organogénesis directa (Kaepler et al., 2000; Saravanan et al., 2011).

- La selección del medio y los reguladores dependiendo de la especie puede llegar a ser un inconveniente hasta que no se encontrase un protocolo eficiente para la propagación de la especie en cuestión (Bhojwani y Dantu, 2013; Shahzad et al., 2017).
- Al igual que en la organogenesis directa se puede dar el caso de que ocurra el fenómeno "*Oxidative Browning*" tal como se muestra en la Figura 8 (Bhojwani y Dantu, 2013; Woldeyes et al., 2021).
- El coste, en este caso, también es un inconveniente a tener en cuenta debido al cultivo intensivo (Bhojwani y Dantu, 2013)

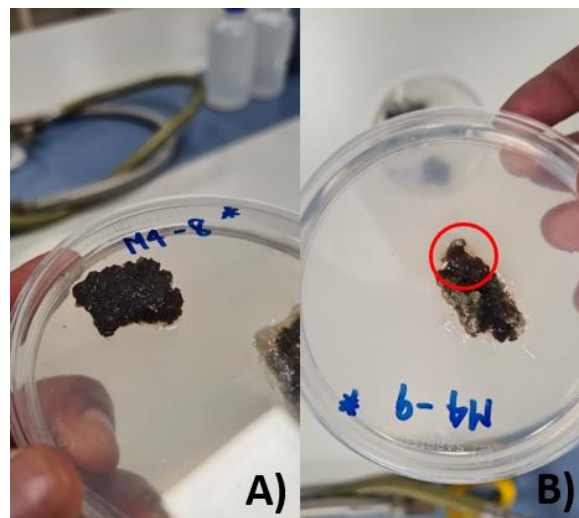


Figura 8: Ejemplo de "*Browning oxidative*" en explantes de *Salvia farinacea* L. En la imagen A) se puede ver el explante necrosado. En la sección B) se puede observar como el medio comienza a ponerse de color marrón. Fuente: Elaboración propia.

## 1.4 Reguladores del crecimiento empleados en cultivo *in vitro*

### 1.4.1 Auxinas

Las auxinas son un grupo de reguladores del crecimiento vegetal que participan fundamentalmente en la elongación celular, y en distintos procesos del crecimiento y desarrollo a lo largo del ciclo vital de las plantas (Lv, Yan, Tian, Zhang, y Ding, 2019; Teale, Paponov, y Palme, 2006). También, están involucradas en la dominancia apical, los tropismos, abscisión y enraizamiento (Bhojwani y Dantu, 2013). La principal auxina

que podemos encontrar en la naturaleza es el ácido indol-3-acético (AIA) (Figura 9). El metabolismo del AIA se compone de biosíntesis, conjugación y degradación, modulando así la producción de otras auxinas y, por lo tanto, el crecimiento (Casanova-Sáez, Mateo-Bonmatí y Ljung, 2021). En la actualidad, se conoce muy bien que el AIA se produce, sobre todo, mediante el operón del triptófano (Trp), la vía del IPyA indol-3-piruvato (Imada, Rolla dos Santos, Oliveira, Hungria, y Rodrigues, 2017) es la ruta biosintética principal y que se ha conservado universalmente en plantas (Imada et al., 2017; Casanova-Sáez et al., 2021).

En micropropagación, la adición de auxinas a bajas concentraciones implica normalmente la estimulación del crecimiento y desarrollo radicular (Bhojwani y Dantu, 2013). De esta forma, este regulador dota a las plantas regeneradas de una ventaja adaptativa tanto *in vitro*, como para asegurar el éxito tras la transferencia a condiciones *ex vitro* (Alkowni et al., 2017).

Algunas auxinas se pueden encontrar de forma natural, como pueden ser: el ácido 4-cloro-indolacético (4-Cl-AIA), ácido fenilacético (AFA), ácido indol butírico (AIB) y el ácido indol propiónico (AIP) (Jordan y Casaretto, 2011). Otros reguladores que se utilizan en cultivo *in vitro* son sintéticos como el ácido  $\alpha$ -naftalenacético (ANA), el ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y para-clorofenoxiacético (p-ACF) (Bhojwani y Dantu, 2013).

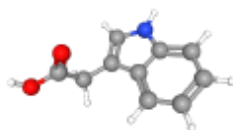


Figura 9: Estructura química del ácido-3-indolacético (AIA). Fuente: Pubchem.

### 1.4.2 Citoquininas

Es el grupo mayoritario en lo referido a reguladores de crecimiento en plantas. Las citoquininas naturales son derivados de adenina que en su posición N<sup>6</sup> en la que se localizan varias sustituciones y se encuentran en las plantas en forma de nucleósidos y nucleótidos (Jordan y Casaretto, 2011; Bhojwani y Dantu, 2013). En la naturaleza están involucradas en la modificación de la dominancia apical, división celular y la diferenciación de brotes.

Estos reguladores del crecimiento se descubrieron tras buscar factores que pudieran promover la proliferación celular (Kieber y Schaller, 2018). Las citoquininas (Figura 10) regulan diversos aspectos del desarrollo y crecimiento de la planta tales como tallos, nodos, raíces. Su mecanismo es regulado mediante una interacción entre las proteínas reguladoras y la cromatina (Potter, Wang, Schaller, y Kieber, 2018).

Esta clase de reguladores de crecimiento son captados por la histidina quinasa (HK), una proteína sensora/quinasa, normalmente transmembrana (Mora, 2021), que se encarga de activar una serie de promotores para producir una serie de respuestas transcripcionales a nivel nuclear (Kubiasová et al., 2020). La localización propuesta para los receptores de estos reguladores fue el retículo endoplasmático (RE) mientras que el transporte sugería que se encontraba relacionado con la membrana plasmática (MP). Tras el ensayo, se concluyó que los receptores del RE pueden entrar en la vía secretora y alcanzar la MP del meristemo apical de la raíz y de las células meristemáticas en división (Kubiasová et al., 2020).

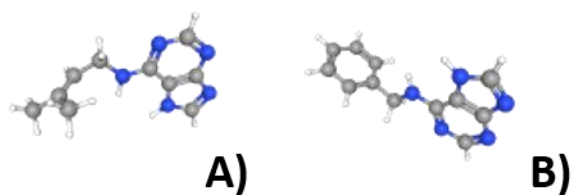


Figura 10: (a); Estructura química de las citoquininas 2-Isopentenyladenina (2iP); (b) 6-Bencilaminopurina (BAP). Fuente: Pubchem

Una vez que estos reguladores son añadidos al medio de cultivo intervienen en procesos como la división celular, la diferenciación de brotes adventicios y la proliferación de brotes mediante brotes axilares debido a la dominancia apical (Kane, 2011).

Existen numerosos estudios recientes de micopropagación en especies de labiadas ibéricas (Juan-Vicedo, Ramírez-Luna, Piqueras, y Casas, 2021). Por ejemplo, el realizado por Yadav Kothari, Kachhwaha, y Joshi, (2019) y la propagación *in vitro* de *Salvia hispanica* L. o el realizado por Mokhtarzadeh, Demirci, Ağalar, Khawar, y Kirimer, (2019), realizó un estudio de cultivo *in vitro* y análisis de compuestos volátiles en *Lavandula stoechas* L. Dentro del género *Thymus* cabe destacar la revisión realizada por Leal et al. (2017) y otros trabajos realizados en especies endémicas valencianas como *Th. moroderi*, que incluía, además, una caracterización del perfil químico de las plantas micropropagadas (Marco-Medina y Casas, 2015). Se han desarrollado otros

estudios de micropropagación y conservación en el género *Thymus*, como el realizado por El Ansari et al. (2020) en *Th. pallidus* Cosson ex Batt o como el estudio desarrollado por Tsoktouridis et al. (2019), relacionado con la micropropagación y caracterización química de *Th. sibthorpii* Benth. Del mismo modo, la micropropagación en *Th. piperella* L. fue estudiada por Sáez et al. (1994) pero los autores no estudiaron el perfil químico del material micropropagado, a pesar del interés que presenta esta especie por el contenido en metabolitos secundarios con actividad biológica. Sin embargo, no existe ningún trabajo publicado hasta la fecha que se centre en la micropropagación de híbridos comerciales de uso popular, ni tampoco estudios de la caracterización química del material micropropagado.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio es desarrollar un protocolo de multiplicación *in vitro* de un híbrido comercial de *Thymus piperella* L. Para alcanzar este objetivo principal, se proponen una serie de objetivos secundarios que se relatan a continuación:

- Obtener un tratamiento de esterilización del material vegetal apropiado para el adecuado inicio del cultivo *in vitro*.
- Valorar el efecto de diversas combinaciones de reguladores del crecimiento (BAP, AIA y 2iP) en el desarrollo de las plántulas *in vitro*.
- Caracterizar cualitativa y cuantitativamente el perfil químico en volátiles tanto del material de cultivo *in vitro* como del silvestre..

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Material Vegetal

Las plantas madre fueron adquiridas en un mercado local de Valencia y se mantuvieron en cultivo en maceta hasta el inicio de los experimentos. No se ha podido determinar la identidad taxonómica precisa del espécimen utilizado (Figura 11) porque no corresponde con ninguno de los híbridos o cultivares descritos hasta la fecha. Sin embargo, atendiendo a sus características organolépticas, a sus caracteres morfológicos diagnóstico (plantas erguidas, con hojas planas, elíptico-ovadas y nervios muy marcados en el envés) y a su fenología (floración otoñal) el espécimen comercial empleado muy probablemente se trate de un híbrido de *Thymus piperella*. Para obtener los explantes, se seleccionó el ejemplar más vigoroso, sin síntomas de patologías, y con presencia de brotación (Figura 11), de entre todas las macetas cultivadas. Los explantes se obtuvieron mediante poda de los tallos con brotes recién formados, para asegurar la presencia de centros meristemáticos y, por lo tanto, con mayor capacidad de división celular y regeneración.



Figura 11: Ejemplar seleccionado para el inicio del cultivo *in vitro*. (izquierda) y detalle de las hojas (derecha).

#### 3.1 Esterilización e inicio del cultivo *in vitro*

Tanto la esterilización como el inicio del cultivo se realizaron en condiciones de flujo laminar; para ello se trabajó en una cabina de flujo laminar horizontal AH-100 (Burdinola, Bizcaia, España) (Figura 12). Todo el material que se utilizó, a excepción del material vegetal, fue autoclavado a una temperatura de 121°C y 1 atm de presión durante 20 minutos. Posteriormente, se sumergieron los tallos seleccionados en vasos de



precipitado de 500 ml autoclavados que contenían una solución de etanol al 70% durante 30 segundos. Posteriormente, se transfirió el material vegetal a una solución de hipoclorito sódico (40 gr/L) al 7% (tratamiento 1) y 15% (tratamiento 2) durante 20 y 15 minutos respectivamente. A continuación, se realizaron 3 lavados en agua destilada estéril. Los dos primeros lavados duraron aproximadamente 1 minuto. En cambio, el tercer lavado fue el más duradero con un tiempo de inmersión de 10 minutos para eliminar al máximo posible los restos de las soluciones empleadas anteriormente en la esterilización, previa transferencia del material vegetal al medio de cultivo.



Figura 12: Cabina de flujo laminar con todo el material necesario para la esterilización e inicio del cultivo *in vitro* (a) y material vegetal siendo esterilizada, pasando por uno de los lavados en agua (b). Fuente: Elaboración propia.

Para el tratamiento 1 (hipoclorito sódico, 40 g/l, 7%, 20 minutos) se utilizaron 77 explantes, mientras que para el tratamiento 2 (hipoclorito sódico, 40 g/l, 15%, 15 minutos) se utilizaron 37 explantes.

El tamaño de cada explante era de entre 0,1-0,2 cm y se cultivaron de forma individual, cogiendo el material con pinzas de micropropagación autoclavadas e introduciendo el explante en tubos de ensayo de 25 x 150 mm (Carolina, Burlington, USA). El medio basal que se escogió para el cultivo *in vitro* fue el medio MS con vitaminas (Murashige y Skoog, 1962). El medio de inicio se realizó en las siguientes proporciones: 4,2 g/l de medio MS (Duchefa Biochemie, Harleem, Países Bajos), 5,5 g/l de agar (Duchefa Biochemie, Harleem, Países Bajos) y 30 g/l de sacarosa (Merck, Darmstadt, Alemania). Los componentes sólidos del medio se pesaron en balanzas de precisión (BL 224 Basic, XS Balance, Carpi, Italia).

Para que el medio de cultivo gelifique de forma adecuada, se mantuvo el pH del medio entre 5,7-5,8. Para ello, el pH fue medido con un phímetro (GLP21, Crison, Barcelona,



España) (Figura 13) el cual fue previamente calibrado con las soluciones tampón pH (7.00) y (4.00). La regulación del pH del medio se llevó a cabo utilizando stocks de la base hidróxido de sodio (NaOH) 3,99 g/l y el ácido clorhídrico (HCl) 3,99 g/l.



Figura 13: Phimetro utilizado para la preparación del inicio del cultivo y el experimento de multiplicación.  
Fuente: Crison.

El inicio del cultivo se llevó a cabo en unas condiciones ambientales de oscuridad durante 10 días en la cámara de cultivo (Equitec, Madrid, España) y manteniendo una temperatura constante de 21°C.

Posteriormente, transcurridos 10 días, los explantes se pasaron a fotoperíodo de 16 horas de luz, la cual fue proporcionada por tubos fluorescentes de luz ultravioleta (Sylvania, Madrid, España). Con respecto a la temperatura, se mantuvo también a 21°C durante todo el experimento. El objetivo era generar un stock de plántula adaptada a las condiciones de cultivo *in vitro* suficientemente numerosa como explantes para llevar a cabo posteriores experimentos de multiplicación.

### **3.2 Multiplicación del cultivo *in vitro***

Una vez se obtuvo el stock, se preparó una batería de 11 tratamientos con diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento para evaluar el efecto de la multiplicación de estos reguladores en *Th. piperella*. Los medios se prepararon en matraces aforados de 1l (Vidrafoc, Barcelona, España). Los reguladores empleados fueron 2-Isopenteniladenina (2iP) (Sigma, Reino Unido) (0,013-0,700 mg/l), 6-Bencilaminopurina (BAP) (Duchefa Biochemie, Harleem, Holanda) (1,48 mg/l) y Ácido indolacético (AIA) (Sigma, Reino Unido) (0,57 mg/l). Los reguladores del crecimiento se adicionaron al medio mediante micropipetas (Gilson, Middleton, USA) de (0,5-10, 10-

100 y 100-1000 µl). El pH de cada medio fue regulado entre 5,7-5,8 tal y como se ha explicado previamente con el phmetro (GLP21, Crison, Barcelona, España).

Los explantes seccionados fueron los brotes apicales y laterales de cada plántula establecida en *in vitro* con un tamaño comprendido entre 0,2-0,3 cm (Figura 14). Los explantes fueron cultivados en botes alimenticios de 500 ml a razón de 10 explantes por bote, constituyendo así una réplica. Cada tratamiento (combinación de reguladores del crecimiento) estaba compuesta por tres réplicas. Los botes también fueron previamente esterilizados a 121°C y 1 atm de presión durante 20 minutos.

El cultivo se realizó en cámara (Equitec, Madrid, España) en condiciones de temperatura constante de 21°C y fotoperiodo 16 horas.

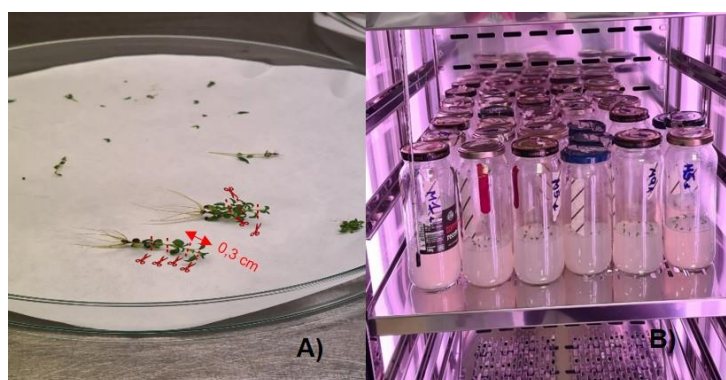


Figura 14: Corte por donde se realiza el cultivo de nodos o múltiples nodos y brotes laterales (a). La sección (B) ilustra la batería de los 11 tratamientos recién cultivados. Fuente: Elaboración propia.

El tratamiento M0 estaba desprovisto de reguladores del crecimiento y fue utilizado como control negativo. El resto de los medios de cultivo empleados en este trabajo fueron diseñados con distintas concentraciones de reguladores del crecimiento tal y como se observa en la Tabla 1. En todos los casos, los medios se formularon sobre una base común de sales inorgánicas MS con vitaminas 4,2 g/l (Duchefa Biochemie, Harleem, Holanda), suplementado con 30 g/l de sacarosa (marca) y solidificado con 5,5 g/l de Plant agar (Duchefa Biochemie, Harleem, Holanda). El tratamiento M1 se suplementó con sólo BAP (Duchefa Biochemie, Harlem, Países Bajos) (1,48 mg/l).

El tratamiento M2 fue diseñado utilizando la concentración óptima obtenida en el experimento de micropropagación desarrollado por Sáez et al. (1994). en *Th. piperella* (0,57 mg/l AIA + 1,48 mg/l BAP).

A partir del tratamiento M3 hasta el tratamiento M6 (tabla 1), se prepararon medios con mezclas de 2iP (Sigma, Reino Unido) y BAP (Duchefa Biochemie, Harleem, Holanda) en concentraciones variables de 2iP (0,013-0,700 mg/l) y una concentración fija de BAP (Duchefa Biochemie, Harleem, Holanda) (1,48 mg/l).

A continuación, desde el medio M7 al medio M10 se utilizó la citoquinina 2iP (Sigma, Reino Unido), a concentraciones entre 0,013 y 0,700 mg/l.

Tabla 1: Reguladores del crecimiento empleados y sus concentraciones en el experimento de multiplicación *in vitro* de *Thymus piperella* L. 2iP: isopentiladenina; IAA: ácido indolacético; BAP: 6-Bencilaminopurina.

Tratamiento	2iP (mg/l)	IAA (mg/l)	BAP (mg/l)
M0	-	-	-
M1	-	-	1,48
M2	-	0,57	1,48
M3	0,013	-	1,48
M4	0,069	-	1,48
M5	0,14	-	1,48
M6	0,7	-	1,48
M7	0,013	-	-
M8	0,069	-	-
M9	0,14	-	-
M10	0,7	-	-

### 3.3 Monitorización del desarrollo vegetal en la fase de inicio

La monitorización del desarrollo vegetal *in vitro* durante la fase de inicio se llevó a cabo mediante el seguimiento de los parámetros morfogénicos que se mencionan a continuación: número de hojas, número de nodos (zona del tallo donde nacen brotes y hojas), número de brotes nuevos (nuevo crecimiento que se produce en la planta, puede incorporar tallo, hojas y yemas), elongación (crecimiento longitudinal), contaminación bacteriana y fúngica (crecimiento de microorganismos en el medio de cultivo), vitrificación o hiperhidratación (la planta presenta anomalías en condiciones excesivas de humedad), etiolación (perdida de cloroplastos y aparición de etioplastos) y número de raíces. La toma de datos y el seguimiento se realizó cada 10 días hasta llegar al día 30 que se realizó un subcultivo en botes alimenticios de 500 ml para proceder al experimento de multiplicación. La elongación fue medida con regla (cm). La toma de datos de los parámetros medidos se realizó mediante el programa informático Excel (Microsoft, USA).

### **3.4 Monitorización y toma de datos de la multiplicación**

En el caso de la multiplicación, el procesamiento y la toma de datos se realizó de la misma manera que se ha mencionado anteriormente, cada 10 días hasta llegar al día número 30 que se realizó la toma de datos final. Los parámetros del desarrollo vegetal medidos fueron el número de hojas, número de nodos, elongación (cm), número de brotes nuevos formados, número de raíces y tamaño de las raíces (cm). De la misma forma, para medir la elongación y el tamaño de las raíces se utilizó una regla (cm) y para la toma de datos fue utilizado el programa Excel (Microsoft, USA).

### **3.5 Tratamiento estadístico de los datos obtenidos**

Para el análisis estadístico de los resultados se empleó el software bioestadístico libre “Infostat” (Universidad Nacional de Córdoba, Costa Rica). El análisis de los resultados de la esterilización e inicio se llevó a cabo mediante el análisis de la varianza de un factor (ANOVA) y las diferencias se analizaron mediante el método de la diferencia menos significativa de Fisher (LSD, por sus siglas en inglés *Least significant difference*), para un nivel de confianza del 99% (error  $\alpha = 0,01$ ).

En el caso de los resultados del análisis estadístico del experimento de multiplicación, se empleó el software bioestadístico libre “Infostat” (Universidad Nacional de Córdoba, Costa Rica) con el análisis de la varianza de un factor (ANOVA). Para el método de la diferencia menos significativa de Fisher se utilizó un nivel de confianza del 99% (error  $\alpha = 0,01$ ) para obtener unos resultados más robustos.

### **3.6 Caracterización química preliminar de los compuestos volátiles presentes en material vegetal en cultivo *in vitro* de *Th. piperella*.**

Para estudiar cómo las condiciones de cultivo *in vitro* pueden afectar a la biosíntesis de compuestos volátiles en el híbrido comercial de *Th. piperella* se comparó el perfil fitoquímico de las plántulas cultivadas *in vitro* bajo los tratamientos que habían mostrado los valores óptimos de desarrollo vegetal (tratamiento control en MS y medio de multiplicación M7) con material vegetal procedente de la planta madre, cultivado en maceta en condiciones ambientales (tratamiento WT, por sus siglas en inglés de *wild type*). Para ello, se seleccionó aquellas plántulas que no mostraron anomalías morfológicas (callo o estructuras amorfas) o desórdenes fisiológicos (signos de vitrificación), sin síntomas de patologías y procedentes de medios sin contaminación.

La preparación del material vegetal se llevó a cabo mediante la extracción de la planta con pinzas de micropropagación, quitando los restos de agar con agua corriente y colocando la planta en placas Petri previamente taradas en la balanza de precisión (BL 224 Basic, XS Balance, Carpi, Italia) (Figura 15). El material vegetal fue posteriormente sometido secado a temperatura ambiente (22-26°C) y oscuridad hasta peso constante, previo a la preparación de los extractos.

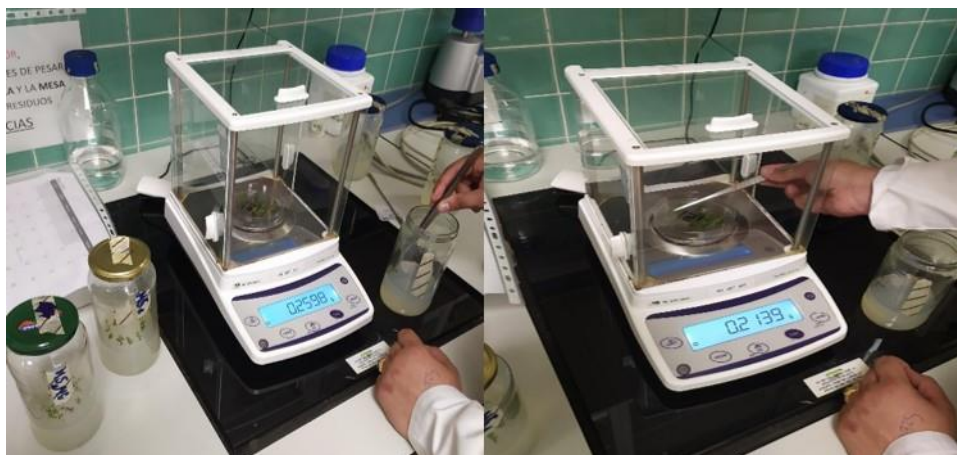


Figura 15: Medición del peso seco de la materia vegetal seleccionada para generar extractos y conocer su composición química. Fuente: Elaboración propia.

Tras el secado, 0,05 g de muestra de material vegetal fue sometido a microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés de *solid phase microextraction*) con posterior análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS, por sus siglas en inglés *gas chromatography–mass spectrometry*) mediante la técnica espacio en cabeza (HS, por sus siglas en inglés *headspace*). Esta técnica permite el análisis de compuestos orgánicos volátiles en un vial cerrado, en equilibrio térmico entre la muestra y la fase gas, para muestrear posteriormente los compuestos presentes en la fase gaseosa mediante un inyector. Los estándares analíticos (patrones) empleados para el análisis fueron adquiridos de Sigma Aldrich (Barcelona, España) y el número de registro CAS puede consultarse, para cada compuesto sujeto a identificación, en la tabla 8 de Resultados. Esta parte del trabajo fue realizada en colaboración con el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Esterilización e inicio

Con el tratamiento de esterilización 1 (Etanol 70% durante 30 segundos e Hipoclorito sódico, 7%, 20 minutos) no se obtuvieron diferencias significativas respecto al tratamiento 2 (Etanol 70% durante 30 segundos e Hipoclorito sódico, 15%, 15 minutos) tras los diez primeros días de cultivo en ninguno de los parámetros estudiados tal y como se muestra en la tabla 2. Respecto a la contaminación, ambos tratamientos mostraron el mismo porcentaje de contaminación por hongos. Sin embargo, el tratamiento 2 mostró mayor porcentaje de contaminación bacteriana.

Ninguno de los parámetros de desarrollo vegetal mostró diferencias significativas entre tratamientos tras los 10 primeros días de cultivo. La etiolación resultó ser del 100% en ambos tratamientos tras los 10 primeros días en oscuridad (Tabla 2; Figura 16).

Tabla 2: El tratamiento 1 (30 segundos Etanol, 40g/l hipoclorito sódico, 7%, 20 minutos) y el tratamiento 2 (30 segundos Etanol, 40 g/l hipoclorito sódico, 15%, 15 minutos). Letras distintas a continuación de los valores numéricos indican diferencias significativas para un nivel de confianza del 99% de acuerdo con el test LSD de Fisher.

Tratamiento	Número de hojas	Tratamiento	Número de nodos
1	5,58 ± 2,67 a	1	3,02 ± 1,34 a
2	5,05 ± 2,07 a	2	2,84 ± 1,01 a

Tratamiento	Número de Tallos	Tratamiento	Elongación (cm)
1	1,38 ± 0,78 a	1	1,59 ± 0,85 a
2	1,43 ± 0,87 a	2	1,58 ± 0,76 a

Tratamiento	Contaminación Hongos (%)	Tratamiento	Contaminación Bacterias (%)
1	1,30 ± 0,18 a	1	1,30 ± 0,18 a
2	0,00 ± 0,00 a	2	2,70 ± 0,26 a

Tratamiento	Contaminación Total (%)	Tratamiento	Vitrificación (%)
1	2,60 ± 0,25 a	1	3,90 ± 0,31 a
2	2,70 ± 0,026 a	2	8,11 ± 0,43 a

Tratamiento	Restauración del crecimiento (%)	Tratamiento	Número de Raíces
1	93,51 ± 0,39 a	1	0,16 ± 0,80 a
2	94,59 ± 0,36 a	2	0,00 ± 0,00 a

Tratamiento	Etiolación (%)
1	100 ± 0,00 a
2	100 ± 0,00 a

Transcurridos los siguientes 10 días y ya en condiciones de fotoperiodo de 16 horas, se obtuvieron diferencias significativas en el número de nodos.

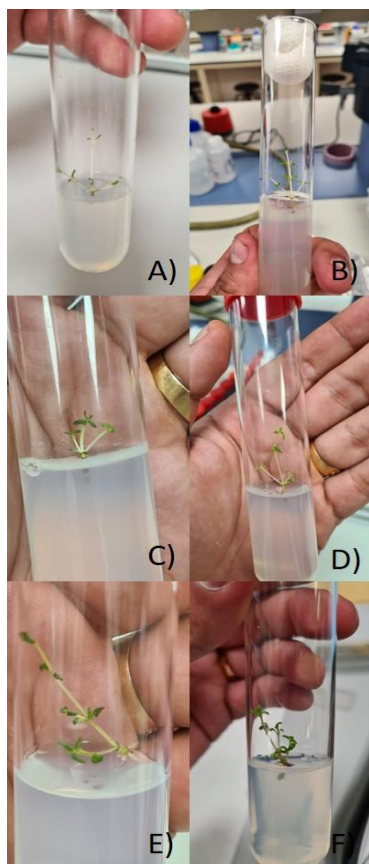


Figura 16: Transición del estado de etiolación hasta llegar a generar cloroplastos. En la sección A) y B) se puede observar un explante completamente etiolado. En las secciones C), D) y E) se muestran explantes en proceso de recuperación hasta llegar a la sección E), en la que el explante se encuentra totalmente recuperado.

Los otros parámetros que fueron medidos no mostraron tampoco diferencias significativas, excepto en el número de nodos. (Tabla 3).

En el caso del número de nodos la diferencia fue significativa mostrando un número de nodos  $3,94 \pm 1,72$  nodos para el tratamiento 1 (Etanol 70% durante 30 segundos e hipoclorito sódico, 7%, 20 minutos) mientras que para el tratamiento 2 (Etanol 70% durante 30 segundos e Hipoclorito sódico, 15%, 15 minutos) el número fue de  $3,08 \pm 1,27$  nodos.

Respecto a la contaminación total, los tratamientos no mantuvieron diferencias significativas entre ellos (Tabla 3), el tratamiento 2 (Etanol 70%, 30 segundos e hipoclorito sódico, 40gr/L, 15%, 15 minutos) resultó tener una contaminación total de

13,51  $\pm$  34,66%, mientras que el tratamiento 1 (Etanol 70% 30 segundos e hipoclorito sódico, 40gr/l, 7%, 20 minutos) tuvo una contaminación total de 5,19  $\pm$  22,33%. Resultando cualquiera de los dos tratamientos efectivos a la hora de llevar a cabo la esterilización de *Thymus piperella* L.

Tabla 3: Resultados tras los primeros 20 días de inicio el cultivo *in vitro*. El tratamiento 1 (30 segundos Etanol 70%, 40g/l hipoclorito sódico, 7%, 20 minutos) y el tratamiento 2 (30 segundos Etanol 70%, 40 g/l hipoclorito sódico, 15%, 15 minutos). Letras distintas a continuación de los valores numéricos indican diferencias significativas para un nivel de confianza del 99% de acuerdo con el test LSD de Fisher.

Tratamiento	Número de hojas	Tratamiento	Número de nodos
1	9,20 $\pm$ 4,70 a	1	3,94 $\pm$ 1,72 a
2	8,05 $\pm$ 2,84 a	2	3,08 $\pm$ 1,27 b

Tratamiento	Número de Tallos	Tratamiento	Elongación (cm)
1	1,45 $\pm$ 0,88 a	1	1,84 $\pm$ 0,85 a
2	1,43 $\pm$ 0,87 a	2	1,93 $\pm$ 0,89 a

Tratamiento	Contaminación Hongos (%)	Tratamiento	Contaminación Bacterias (%)
1	3,90 $\pm$ 9,40 a	1	3,90 $\pm$ 19,40 a
2	8,11 $\pm$ 27,67 a	2	8,11 $\pm$ 27,67 a

Tratamiento	Contaminación Total (%)	Tratamiento	Vitrificación (%)
1	5,19 $\pm$ 22,33 a	1	2,60 $\pm$ 16 a
2	13,51 $\pm$ 34,66 a	2	2,70 $\pm$ 16,43 a

Tratamiento	Restauración del crecimiento (%)	Tratamiento	Número de Raíces
1	90,90 $\pm$ 28,94 a	1	1,94 $\pm$ 2,2 a
2	91,89 $\pm$ 27,67 a	2	2,46 $\pm$ 2,77 a

Tratamiento	Etiolación (%)
1	100 $\pm$ 0,00 a
2	100 $\pm$ 0,00 a

#### 4.2 Multiplicación de *Th. piperella*

Los datos obtenidos del experimento de multiplicación incluyen una batería de 11 tratamientos con diferentes reguladores del crecimiento tras 10, 20 y 30 días de cultivo.

En los primeros 10 días se pudo observar (Tabla 4) que el tratamiento M0 (sin reguladores) y el M7 (suplementado con 2iP a una concentración de 0,013 mg/l) comenzaron siendo los medios que mejor rindieron para el número de hojas (7,47  $\pm$  2,78 hojas) y (7,37  $\pm$  2,28 hojas) respectivamente, pero sin mantener diferencias significativas



con los otros tratamientos. Solo se observó una diferencia significativa para el número de hojas formadas, fue entre el tratamiento M0 ( $7,47 \pm 2,78$  hojas) y M4 (suplementado con BAP a una concentración de 1,48 mg/l y 2iP a una concentración de 0,069 mg/l) ( $6,20 \pm 2,50$  hojas).

Para el número de nodos el tratamiento M0 ( $2,90 \pm 1,09$  nodos) y M7 ( $2,70 \pm 1,29$  nodos) en este caso, mostraron diferencias significativas con todos los tratamientos excepto M1 (suplementado con BAP a una concentración de 1,48 mg/l) ( $2,27 \pm 2,44$  nodos).

Para el número de brotes el tratamiento M1 generó ( $1,37 \pm 0,61$ ), el tratamiento M3 (suplementado con BAP a una concentración de 1,48 mg/l y 2iP a una concentración de 0,013 mg/l) ( $1,33 \pm 0,48$ ) y tratamiento M6 (suplementado con BAP a una concentración de 1,48 mg/l y 2iP a una concentración de 0,7 mg/l) ( $1,33 \pm 0,55$ ) fueron los más efectivos durante estos 10 primeros días, aunque no mostraron diferencias significativas con otros tratamientos. Excepto con los tratamientos M8 (Suplementado con 2iP a una concentración de 0,069 mg/l) generando ( $1,00 \pm 0,00$ ) y M10 (Suplementado con 2iP a una concentración de 0,7 mg/l) ( $1,03 \pm 0,49$ ).

En lo referido a la elongación, el medio M0 ( $1,26 \pm 0,62$  cm), el tratamiento M4 ( $1,33 \pm 0,48$ ) ( $0,94 \pm 0,47$  cm) y tratamiento M7 ( $0,92 \pm 0,42$  cm), fueron los tratamientos más efectivos a lo largo de estos 10 días, sin embargo, el tratamiento M0 mantuvo diferencias significativas con los demás medios.

Tanto para el enraizamiento (medido con el número de raíces y tamaño de estas), el tratamiento M0 mostró ( $3,63 \pm 1,96$  raíces y  $0,41 \pm 0,29$  cm) y el tratamiento M7 ( $1,77 \pm 0,34$  raíces y  $0,32 \pm 0,34$  cm) mostraron los mayores valores en comparación al resto de tratamientos. Para el tamaño de las raíces no hubo diferencias significativas entre ambos tratamientos (M0 y M7) para un nivel de confianza del 99%, pero sí que las hubo entre éstos y los demás tratamientos aplicados. Sin embargo, para el número de raíces el tratamiento M0 mostró diferencias significativas frente a los otros tratamientos, incluido el M7.

Tabla 4: Multiplicación *in vitro* del híbrido comercial de *Thymus piperella* L. tras los 10 primeros días de cultivo. Letras distintas a continuación de los valores numéricos indican diferencias significativas para un nivel de confianza del 99% de acuerdo con el test LSD de Fisher.

Tratamiento	Concentraciones (mg/l)	Número de hojas (10 días)	Tratamiento	Número de nodos (10 días)
M0	-	7,47 ± 2,78 a	M0	2,90 ± 1,09 a
M1	BAP 1,48	6,70 ± 2,43 ab	M1	2,27 ± 2,44 abcd
M2	BAP 1,48 + 0,57 AIA	6,27 ± 2,50 ab	M2	1,80 ± 2,50 d
M3	BAP 1,48 + 0,013 2iP	5,77 ± 1,98 ab	M3	2,03 ± 1,98 cd
M4	BAP 1,48 + 0,069 2iP	6,20 ± 2,50 bc	M4	2,23 ± 0,81 bcde
M5	BAP 1,48 + 0,14 2iP	6,73 ± 2,56 ab	M5	2,53 ± 1,25 abc
M6	BAP 1,48 + 0,7 2iP	6,40 ± 2,14 ab	M6	2,50 ± 0,86 abc
M7	0,013 2iP	7,37 ± 2,28 ab	M7	2,70 ± 1,29 ab
M8	0,069 2iP	5,93 ± 1,91 ab	M8	1,67 ± 0,71 d
M9	0,14 2iP	6,10 ± 3,14 ab	M9	2,00 ± 1,14 cd
M10	0,7 2iP	5,90 ± 2,67 ab	M10	1,97 ± 1,00 cd

Tratamiento	Concentraciones (mg/l)	Número de brotes (10 días)	Tratamiento	elongación (cm) (10 días)
M0	-	1,13 ± 0,43 abc	M0	1,26 ± 0,62 a
M1	BAP 1,48	1,37 ± 0,61 a	M1	0,81 ± 0,35 bc
M2	BAP 1,48 + 0,57 AIA	1,07 ± 0,25 abc	M2	0,58 ± 0,27 c
M3	BAP 1,48 + 0,013 2iP	1,33 ± 0,48 ab	M3	0,69 ± 0,33 bc
M4	BAP 1,48 + 0,069 2iP	1,07 ± 0,25 abc	M4	0,94 ± 0,47 b
M5	BAP 1,48 + 0,14 2iP	1,30 ± 0,53 abc	M5	0,86 ± 0,40 bc
M6	BAP 1,48 + 0,7 2iP	1,33 ± 0,55 ab	M6	0,81 ± 0,35 bc
M7	0,013 2iP	1,17 ± 0,38 abc	M7	0,92 ± 0,42 b
M8	0,069 2iP	1,00 ± 0,00 c	M8	0,82 ± 0,34 bc
M9	0,14 2iP	1,17 ± 0,59 abc	M9	0,80 ± 0,57 bc
M10	0,7 2iP	1,03 ± 0,49 bc	M10	0,88 ± 0,47 b

Tratamiento	Concentraciones (mg/l)	Número de raíces (10 días)	Tratamiento	Tamaño raíces (cm) (10 días)
M0	-	3,63 ± 1,96 a	M0	0,41 ± 0,29 a
M1	BAP 1,48	0 ± 0 c	M1	0 ± 0 c
M2	BAP 1,48 + 0,57 AIA	0 ± 0 c	M2	0 ± 0 c
M3	BAP 1,48 + 0,013 2iP	0 ± 0 c	M3	0 ± 0 c
M4	BAP 1,48 + 0,069 2iP	0 ± 0 c	M4	0 ± 0 c
M5	BAP 1,48 + 0,14 2iP	0 ± 0 c	M5	0 ± 0 c
M6	BAP 1,48 + 0,7 2iP	0 ± 0 c	M6	0 ± 0 c
M7	0,013 2iP	1,77 ± 0,34 b	M7	0,32 ± 0,34 a
M8	0,069 2iP	0,43 ± 0,94 c	M8	0,09 ± 0,20 bc
M9	0,14 2iP	0,37 ± 0,85 c	M9	0,12 ± 0,26 b
M10	0,7 2iP	0 ± 0 c	M10	0 ± 0 c

Tras los diez primeros días de cultivo se localizaron focos de contaminación (Figura 17) en los tratamientos M4 (suplementado con BAP a una concentración de 1,48 mg/l y 2iP a una concentración de 0,069 mg/l), M8 (Suplementado con 2iP a una concentración de 0,069 mg/l) y M10 (Suplementado con 2iP a una concentración de 0,7 mg/l). Los cultivos fueron sometidos a examen visual y todos aquellos explantes que no parecían estar en contacto con colonias de bacterias fueron subcultivados en medio fresco con los respectivos tratamientos para intentar salvar los explantes. El subcultivo no fue efectivo

contra la contaminación y, por lo tanto, estos explantes no fueron contabilizados en los siguientes experimentos tras 20 y 30 días de cultivo.

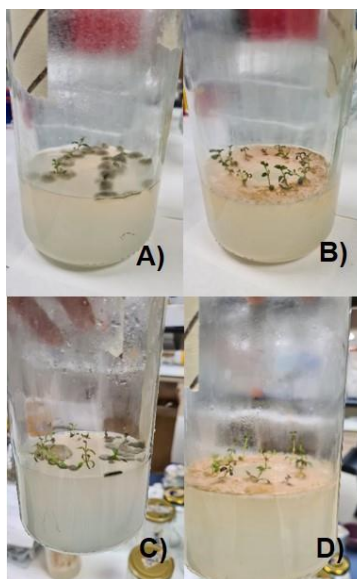


Figura 17: Contaminación fúngica del medio M8 (A). La sección (C) de la misma manera, muestra contaminación fúngica del medio (M10). las secciones (B) y (D) nos muestran contaminación bacteriana del (M4) en dos cultivos.

Al comenzar el día 20 se procedió a la toma de datos de desarrollo vegetal en cultivo *in vitro*.

Los resultados para el número de hojas de nuevo mostraron valores máximos para el tratamiento M0, desprovisto de reguladores del crecimiento, ( $11,13 \pm 4,16$  hojas) y el M7, suplementado con 2iP a una concentración de 0,013 mg/l ( $12,17 \pm 5,86$  hojas), con diferencias significativas frente a los otros tratamientos. Para el número de nodos, de igual manera, el tratamiento M7 ( $3,83 \pm 1,92$  nodos) y M0 ( $3,60 \pm 1,35$  nodos) se impusieron frente a los otros tratamientos mostrando diferencias significativas.

Respecto al número de brotes, el tratamiento M5 (suplementado con BAP a una concentración de 1,48 mg/l y 2iP a una concentración de 0,14 mg/l) ( $1,73 \pm 0,83$  brotes), M7 ( $1,60 \pm 1,13$  brotes) y M1 (suplementado con BAP a una concentración de 1,48 mg/l) ( $1,57 \pm 0,73$  brotes) se impusieron a los demás tratamientos, aunque no mostraron diferencias significativas con ellos. En definitiva, ningún tratamiento mostró diferencias significativas tras los primeros 20 días de cultivo

Respecto a la elongación, el tratamiento M0 ( $1,61 \pm 0,71$  cm) y el tratamiento M7 ( $1,31 \pm 0,54$  cm) mostraron diferencias significativas frente a los otros medios estudiados.

En cambio, respecto al número de raíces, el tratamiento M0 ( $5,13 \pm 2,84$  raíces) mantiene diferencias significativas frente al resto de tratamientos. El tamaño de las raíces del tratamiento M7 ( $0,79 \pm 0,80$  cm) fue el que más destacó en este parámetro, aunque no tuvo diferencias significativas frente al medio M0 ( $0,71 \pm 0,44$  cm), pero sí frente a los tratamientos restantes a los 20 días de cultivo.

Tabla 5: Multiplicación *in vitro* del híbrido comercial de *Thymus piperella* L. tras 20 días desde que se inició el cultivo. Letras distintas a continuación de los valores numéricos indican diferencias significativas para un nivel de confianza del 99% de acuerdo con el test LSD de Fisher.

Tratamiento	Concentraciones (mg/l)	Número de hojas (20 días)	Tratamiento	Número de nodos (20 días)
M0	-	$11,13 \pm 4,16$ ab	M0	$3,60 \pm 1,35$ ab
M1	BAP 1,48	$10,37 \pm 4,05$ abc	M1	$3,07 \pm 1,68$ abc
M2	BAP 1,48 + 0,57 AIA	$8,04 \pm 2,94$ cd	M2	$2,63 \pm 0,88$ c
M3	BAP 1,48 + 0,013 2iP	$8,00 \pm 3,21$ bcd	M3	$2,87 \pm 0,94$ bc
M4	BAP 1,48 + 0,069 2iP	x	M4	x
M5	BAP 1,48 + 0,14 2iP	$9,30 \pm 2,15$ bcd	M5	$3,17 \pm 1,12$ abc
M6	BAP 1,48 + 0,7 2iP	$9,40 \pm 3,05$ bcd	M6	$2,90 \pm 1,03$ abc
M7	0,013 2iP	$12,17 \pm 5,86$ a	M7	$3,83 \pm 1,92$ a
M8	0,069 2iP	$7,55 \pm 3,11$ cd	M8	$2,55 \pm 1,05$ c
M9	0,14 2iP	$9,00 \pm 4,69$ bcd	M9	$3,15 \pm 2,09$ abc
M10	0,7 2iP	$7,20 \pm 2,69$ d	M10	$2,70 \pm 0,80$ bc

Tratamiento	Concentraciones (mg/l)	Número de brotes (20 días)	Tratamiento	elongación (cm) (20 días)
M0	-	$1,30 \pm 0,43$ ab	M0	$1,61 \pm 0,71$ a
M1	BAP 1,48	$1,57 \pm 0,73$ ab	M1	$0,94 \pm 0,36$ cde
M2	BAP 1,48 + 0,57 AIA	$1,52 \pm 0,80$ ab	M2	$0,68 \pm 0,31$ e
M3	BAP 1,48 + 0,013 2iP	$1,60 \pm 0,81$ ab	M3	$0,78 \pm 0,27$ de
M4	BAP 1,48 + 0,069 2iP	x	M4	x
M5	BAP 1,48 + 0,14 2iP	$1,73 \pm 0,83$ a	M5	$1,02 \pm 0,35$ bcd
M6	BAP 1,48 + 0,7 2iP	$1,47 \pm 0,63$ ab	M6	$0,95 \pm 0,37$ cde
M7	0,013 2iP	$1,60 \pm 1,13$ ab	M7	$1,31 \pm 0,54$ ab
M8	0,069 2iP	$1,05 \pm 0,22$ b	M8	$1,09 \pm 0,58$ bcd
M9	0,14 2iP	$1,52 \pm 1,01$ ab	M9	$1,01 \pm 0,64$ bcde
M10	0,7 2iP	$1,05 \pm 0,22$ b	M10	$1,18 \pm 0,47$ bc

Tratamiento	Concentraciones (mg/l)	Número de raíces (20 días)	Tratamiento	Tamaño raíces (cm) (20 días)
M0	-	$5,13 \pm 2,84$ a	M0	$0,71 \pm 0,44$ ab
M1	BAP 1,48	$0 \pm 0$ d	M1	$0 \pm 0$ d
M2	BAP 1,48 + 0,57 AIA	$0 \pm 0$ d	M2	$0 \pm 0$ d
M3	BAP 1,48 + 0,013 2iP	$0 \pm 0$ d	M3	$0 \pm 0$ d
M4	BAP 1,48 + 0,069 2iP	x	M4	x
M5	BAP 1,48 + 0,14 2iP	$0 \pm 0$ d	M5	$0 \pm 0$ d
M6	BAP 1,48 + 0,7 2iP	$0,00 \pm 0,00$ d	M6	$0,0 \pm 0,00$ d
M7	0,013 2iP	$2,50 \pm 2,49$ b	M7	$0,79 \pm 0,80$ a
M8	0,069 2iP	$0,90 \pm 1,55$ cd	M8	$0,21 \pm 0,35$ cd
M9	0,14 2iP	$1,19 \pm 1,55$ c	M9	$0,47 \pm 0,54$ bc
M10	0,7 2iP	$0,15 \pm 0,618$ cd	M10	$0,02 \pm 0,11$ d

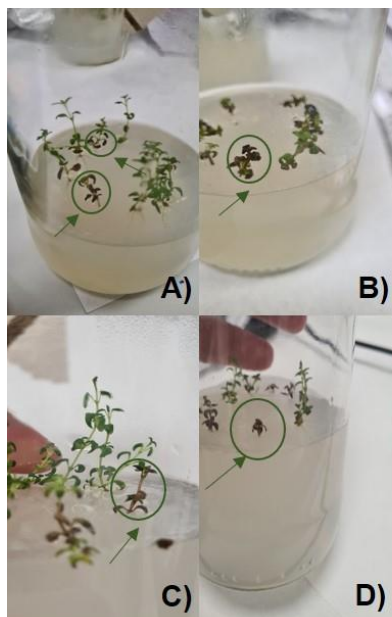


Figura 18: Explantes con tejido necrosado. la imagen (A) nos muestra el (M7) con explantes necrosados. La sección (B) se trata del medio (M2). La sección (C) nos muestra explantes necrosados en medio (MS). Por último, la sección (D) se trata del medio (M5).

Transcurridos 30 días se volvió a tomar datos para obtener los resultados finales de multiplicación en *Th. piperella*, descartando de la toma de datos aquellos explantes con signos de necrosis (Figura 18).

Los resultados obtenidos tras los 30 días de cultivo muestran que los tratamientos que mejores resultados mostraron para los parámetros de desarrollo vegetal estudiados fueron el M7 (Suplementado con 2iP a una concentración de 0,013 mg/l) y M0 (Desprovisto reguladores del crecimiento) tal y como se observa en la Tabla 6. Concretamente para el número de hojas, el tratamiento M7 fue el que mejores resultados mostró ( $17,47 \pm 7,27$  hojas) aunque no mantuvo diferencias significativas frente al tratamiento M0 ( $17,47 \pm 7,09$  hojas) para un nivel de confianza del 99%. Con respecto al medio M1 (suplementado con BAP a una concentración de 1,48 mg/l), la diferencia tampoco fue significativa, aunque el número de hojas fue menor.

El tratamiento que mejores resultados mostró para el número de nodos fue el M7 ( $5,73 \pm 2,09$  nodos), el cual mostró diferencias significativas respecto a los otros medios que se sometieron a estudio en la medición de este parámetro.

El tratamiento M7 (suplementado con 2iP a una concentración de 0,013 mg/l) fue también el medio que mayor número de brotes mostró ( $2,13 \pm 1,36$  brotes) mostrando diferencias significativas con todos los tratamientos excepto con el M1 (suplementado

con BAP a una concentración de 1,48 mg/l) ( $2,07 \pm 0,80$  brotes), M9 (suplementado con 2iP a una concentración de 0,14 mg/l) ( $1,71 \pm 0,91$  brotes) y el M5 (suplementado con BAP a una concentración de 1,48 mg/l y 2iP a una concentración de 0,14 mg/l) ( $1,55 \pm 0,67$  brotes).

Respecto a la elongación, el tratamiento M7 ( $1,98 \pm 0,46$  cm) y el tratamiento sin reguladores del crecimiento, M0 ( $1,86 \pm 0,79$  cm), M8 (Suplementado con 2iP a una concentración de 0,069 mg/l), M9 (Suplementado con 2iP a una concentración de 0,14 mg/l) y M10 (suplementado con 2iP a una concentración de 0,7 mg/l) no mostraron ninguna diferencia significativa entre sí, pero mantuvieron diferencias significativas con el resto de los tratamientos aplicados.

Para el número de raíces, el tratamiento M0, sin reguladores, ( $5,92 \pm 2,41$  cm) y el tratamiento M7 (Suplementado con 2iP a una concentración de 0,013 mg/l) ( $5,20 \pm 2,40$  cm) no mostraron ninguna diferencia significativa entre sí, pero fueron significativamente mayores en comparación con los otros medios. Respecto al tamaño de las raíces, el tratamiento M7 ( $1,41 \pm 0,52$  cm) y M9 ( $1,03 \pm 0,79$ ) fueron los que mostraron diferencias significativas respecto a los otros medios.

Como curiosidad el tratamiento M2(suplementado con BAP a una concentración de 1,48 mg/l y AIA a una concentración de 0,57 mg/l) basado en los resultados óptimos de Sáez et al. (1994) generó callo (Figura 19) con la combinación de citoquinina (BAP) y la auxina (AIA).



Figura 19: Callo generado en *Thymus piperella* L. con el tratamiento M2

Tabla 6: Multiplicación *in vitro* del híbrido comercial de *Thymus piperella* L. tras 30 días desde el inicio del experimento. Letras distintas a continuación de los valores numéricos indican diferencias significativas para un nivel de confianza del 99% de acuerdo con el test LSD de Fisher.

Tratamiento	Concentraciones (mg/l)	Número de hojas (30 días)	Tratamiento	Número de nodos (30 días)
M0	-	17,47 ± 7,09 ab	M0	4,42 ± 1,44 b
M1	BAP 1,48	13,47 ± 4,29 abc	M1	4,07 ± 1,22 bc
M2	BAP 1,48 + 0,57 AIA	8,17 ± 2,71 d	M2	2,44 ± 1,29 d
M3	BAP 1,48 + 0,013 2iP	8,00 ± 1,89 d	M3	2,95 ± 0,62 cd
M4	BAP 1,48 + 0,069 2iP	x	M4	x
M5	BAP 1,48 + 0,14 2iP	8,55 ± 2,43 d	M5	3,00 ± 0,69 cd
M6	BAP 1,48 + 0,7 2iP	10,83 ± 5,32 cd	M6	3,43 ± 1,31 bcd
M7	0,013 2iP	17,47 ± 7,27 a	M7	5,73 ± 2,09 a
M8	0,069 2iP	10,25 ± 3,11 cd	M8	3,88 ± 1,36 bc
M9	0,14 2iP	12,00 ± 3,84 bcd	M9	4,36 ± 1,22 b
M10	0,7 2iP	10,00 ± 2,83 cd	M10	3,17 ± 0,41 bcd

Tratamiento	Concentraciones (mg/l)	Número de brotes (30 días)	Tratamiento	elongación (cm) (30 días)
M0	-	1,25 ± 0,51 c	M0	1,86 ± 0,79 a
M1	BAP 1,48	2,07 ± 0,80 ab	M1	1,24 ± 0,20 bcde
M2	BAP 1,48 + 0,57 AIA	1,44 ± 0,62 bc	M2	0,89 ± 0,30 de
M3	BAP 1,48 + 0,013 2iP	1,32 ± 0,58 bc	M3	0,83 ± 0,27 e
M4	BAP 1,48 + 0,069 2iP	x	M4	x
M5	BAP 1,48 + 0,14 2iP	1,55 ± 0,67 abc	M5	1,09 ± 0,34 cde
M6	BAP 1,48 + 0,7 2iP	1,48 ± 0,67 bc	M6	1,25 ± 0,54 bcd
M7	0,013 2iP	2,13 ± 1,36 a	M7	1,98 ± 0,46 a
M8	0,069 2iP	1,25 ± 0,46bc	M8	1,65 ± 0,43 ab
M9	0,14 2iP	1,71 ± 0,91 abc	M9	1,51 ± 0,46 abc
M10	0,7 2iP	1 ± 0c	M10	1,47 ± 0,16 abc

Tratamiento	Concentraciones (mg/l)	Número de raíces (30 días)	Tratamiento	Tamaño raíces (30 días)
M0	-	5,92 ± 2,41 a	M0	0,96 ± 0,45 b
M1	BAP 1,48	0 ± 0 c	M1	0 ± 0 d
M2	BAP 1,48 + 0,57 AIA	0 ± 0 c	M2	0 ± 0 d
M3	BAP 1,48 + 0,013 2iP	0 ± 0 c	M3	0 ± 0 d
M4	BAP 1,48 + 0,069 2iP	x	M4	x
M5	BAP 1,48 + 0,14 2iP	0 ± 0 c	M5	0 ± 0 d
M6	BAP 1,48 + 0,7 2iP	0,35 ± 1,03 c	M6	0,26 ± 0,71 cd
M7	0,013 2iP	5,20 ± 2,40 a	M7	1,41 ± 0,52 a
M8	0,069 2iP	2 ± 2,06 b	M8	0,75 ± 0,68 bc
M9	0,14 2iP	1,79 ± 1,63 b	M9	1,03 ± 0,79 ab
M10	0,7 2iP	0,67 ± 1,21 bc	M10	0,17 ± 0,29 cd

En la figura 20 se pueden observar algunos de los resultados de las mediciones de los parámetros que han sido descritos con anterioridad. Algunos de los ejemplos que se ilustran son los brotes, raíces, la elongación y el tamaño de las raíces.

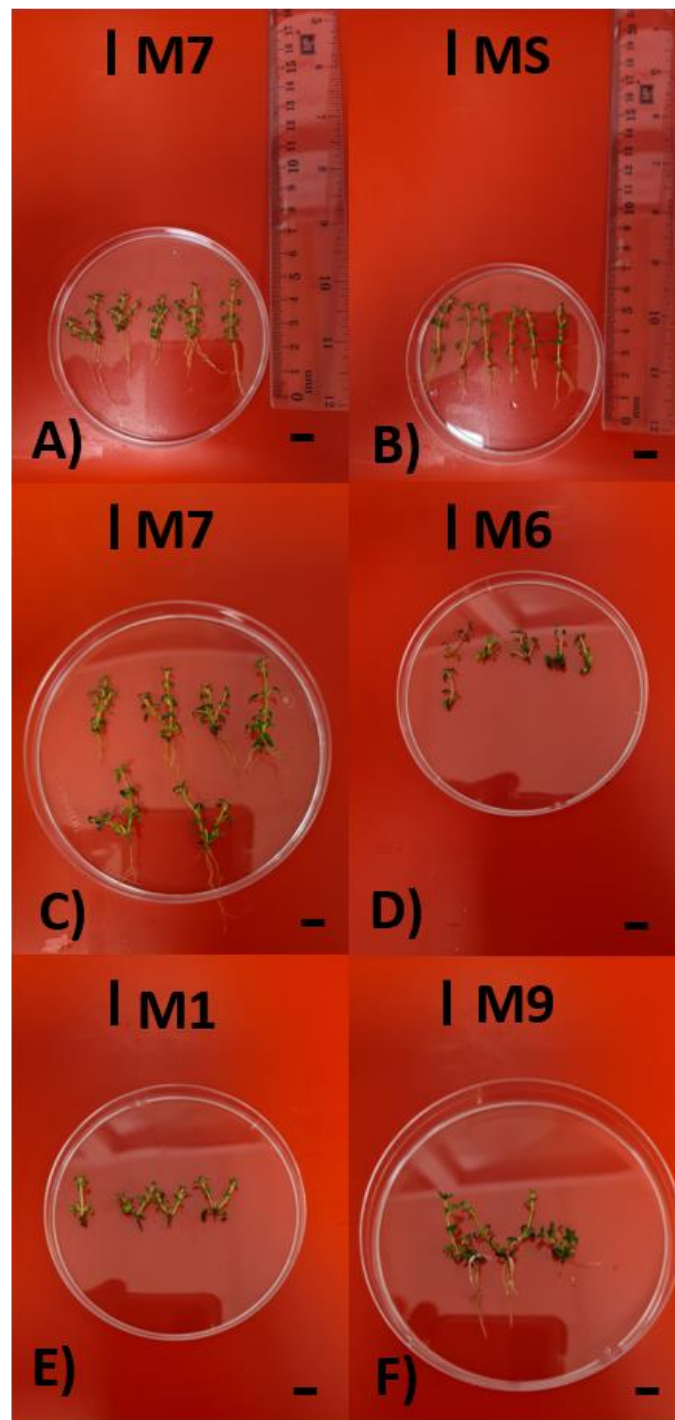


Figura 20: En esta imagen podemos observar diferentes medios utilizados. En la sección (A) y (C) se puede observar el tratamiento M7 en el cual se puede ver un gran número de brotes y un tamaño de raíz superior a los demás. La sección (B) nos muestra el tratamiento M0, el cual muestra un número superior de raíces superior al resto. Las secciones (D) y (E) muestran los medios M6 y M1 respectivamente, los cuales no destacaron mucho en elongación, pero el medio M1 generó más brotes. La línea horizontal corresponde al tamaño de 1 cm, mientras que la línea vertical corresponde a 2 cm.



#### 4.3 Caracterización química preliminar de los compuestos volátiles presentes en material vegetal en cultivo *in vitro* de *Th. piperella*.

Las plántulas escogidas para realizar la caracterización química de los compuestos volátiles fueron aquellas cultivadas *in vitro* en medio M0 (sin reguladores del crecimiento) y M7 (suplementado con 2iP a una concentración de 0,013 mg/l) debido a que los explantes que se desarrollaron en éstos fueron los que mejores resultados presentaron en los parámetros de desarrollo vegetal analizados. Como tratamiento control, se tomó una muestra de la planta madre (*wild type*) para poder comparar si había diferencias en la composición química entre esta y las plántulas cultivadas *in vitro*. Tras retirar los explantes de los botes donde fueron cultivados, se procedió a la medición del peso para monitorizar la pérdida de agua hasta obtener un peso seco estable (Tabla 7) y poder realizar el análisis fitoquímico de compuestos volátiles.

Tabla 7: Monitorización del contenido en agua de las muestras de *Thymus piperella* L., durante 10 días de secado.

Tiempo (días)	Wild type (gr)	Medio (M7) (gr)	Medio (M0) (gr)
Día 1	3,09	0,795	0,927
Día 5	1,093	0,0785	0,0808
Día 10	1,048	0,0743	0,075

La última medición del peso seco del material vegetal nos mostró que la planta *wild type*, tras 10 días de secado, mostró un 33,91% (1,048 g) de peso seco, es decir, perdió un 66,09% de su peso total. En el caso del tratamiento M7, el porcentaje de peso seco resultante fue de 9,18% (0,0743 gr) y en el caso del tratamiento M0, el resultado del peso seco fue de 8,09% (0,075 gr). Cabe destacar que la materia vegetal necesaria para que el análisis de los componentes químicos de *Th. piperella* fuera satisfactorio, era necesario disponer de un total de 0,03 gramos, fue la cantidad estipulada que se comunicó desde la Universidad de Zaragoza.

Los resultados de los análisis de los componentes químicos se muestran a continuación (Tabla 8). Los compuestos mayoritarios en (% área) para todo el material vegetal analizado (WT, M7 y M0) fueron el timol, p-cimeno, gamma-terpineno, carvacrol, beta-cariofileno y linalool.

Tanto el tratamiento M0 y M7 manifestaron 2 nuevos compuestos respecto a la planta *wild type*. Los compuestos en cuestión son el acetato de carvacrol y cupareno.

Tabla 8: Análisis del materia vegetal HS/SPME-GC-M. Método HS\_SPME\_60C\_15min\_rampa. Análisis directo 0,05 g de muestra los compuestos que se señalan en azul se identificaron ratificándolos mediante un patrón común. Los marcados en rojo solo se manifestaron en las especies propagadas en condiciones de cultivo *in vitro*. Los compuestos en cuestión son el cupareno y carvacrol.

tr	CAS	Compounds	WT_FG	M0_FG	M7_RG	WT_FG	M0_FG	M7_RG
8,57	99-83-2	alpha- pheilandrene	16510950	11282032	14917814	0,61	0,57	0,49
10,18	127-91-3	beta-pinene	69535854	14076588	4470271	0,26	0,21	0,15
10,45	3391-86-4	1-octen-3-ol	17885880	26061260	24202628	0,66	1,33	0,79
10,84	123-35-3	m yrcene	22613120	31861415	36636375	0,84	1,62	1,19
11,67	99-86-5	alpha-terpinene	22533752	16984318	25724805	0,84	0,86	0,84
11,92	99-87-5	p-cimene	600631650	237439948	249145803	22,33	12,09	8,12
12,81	3338-55-4	beta-cis-ocimene	4911315	2236873	3982638	0,18	0,11	0,13
13,12	99-85-4	gamma-terpinene	173218073	114481323	224263144	6,44	5,83	7,31
14,12	586-63-0	terpinolene	19304500	5754265	8011802	0,72	0,29	0,26
14,51	78-70-6	linalool	151794248	61893921	80515087	5,64	3,15	2,62
16,38	124-76-5	isoborneol	12963250	12738411	12064298	0,48	0,65	0,39
16,66	562-74-3	terpinen-4-ol	20351601	5646682	6501186	0,76	0,29	0,21
16,98	98-55-5	alpha-terpineol	22282764	3409374	4587036	0,83	0,17	0,15
17,22	112-40-3	dodecano	1456787	2414470	2857001	0,05	0,12	0,09
17,33	122-31-2	decanal	8923863	6136596	4694293	0,33	0,31	0,15
17,93	1076-56-8	thymol menthyl ether	4042911	4456113	3357503	0,15	0,23	0,11
18,24	490-91-5	thymoquinone	19376889	29668744	40944911	0,72	1,51	1,33
19,1	89-83-8	thymol	1208302195	1080251682	1856404323	44,91	55	60,52
19,22	499-75-2	carvacrol	119323771	77845725	145357184	4,44	3,96	4,74
20,07	528-79-0	thymol acetate	8464634	63800630	108502168	0,31	3,25	3,54
20,26	469-92-1	clovene	756217	594769	772456	0,03	0,03	0,03
20,37	6380-28-5	caracryl acetate		2866515	4635565		0,15	0,15
20,43	8	alpha-cubebene	1834691	1310790	1077882	0,07	0,07	0,07
20,51	3856-25-5	alpha-copanene	2554839	1955431	2219037	0,09	0,1	0,07
20,65	5208-59-3	(-)-beta-bourbonene	4314492	1560831	893270	0,16	0,08	0,03
20,78	629-59-4	tetradecane	5040724	6912045	5553557	0,19	0,35	0,18
20,99	140072	isocaryophyllene	1896702	1392919	1761144	0,07	0,07	0,06
21,18	87-44-5	beta-caryophyllene	150247286	97848015	131496564	5,58	4,98	4,29
21,3	136296-38-3	dimetil-2,6-dimethylen	3956297	2033822	3931024	0,15	0,1	0,13
21,36	17699-05-7	alpha-bergamotene	6290747	1093780	890489	0,23	0,06	0,03
21,6	68832-35-9	beta-caryophyllene	2360312	1763496	2288349	0,09	0,09	0,07
21,67	6753-98-6	alpha-humelene	6227868	4805806	6866540	0,23	0,24	0,22
21,79	374189	beta-caopaene	1086119	3385669	4076064	0,04	0,17	0,13
21,96	22567-17-5	gamma-qurjunene	6207905	3995762	5092349	0,23	0,2	0,17
22,27	31983-22-9	alpha-murolene	4490947	3971432	59355884	0,17	0,2	0,19
22,38	16982-006	cuparene		4788495	4755899		0,24	0,16
22,47	39029-41-9	gamma-cadinene	8150046	5801750	6131835	0,3	0,3	0,2
22,56	483-76-1	(+)-delta-cadinene	14277811	10404940	13949357	0,53	0,53	0,45
22,71	16728-99-7	naphtalene	653452	1545630	1562458	0,02	0,08	0,05
22,77	24406-05-1	alpha-cadiene	1398440	1787406	1552477	0,05	0,09	0,05
22,85	21391-991	α-calacorene	2009817	2287521	2455007	0,07	0,12	0,08
23,34	1139-30-6	caryophyllene oxide	3238497	787682	552960	0,12	0,04	0,02
23,85	1209-71-8	delta-eudesmol	1444378	2648562	1674672	0,05	0,13	0,05

En el análisis cromatográfico HS-SPME-GC-MS (Figura 21) se muestran los compuestos químicos que en mayor abundancia se encuentran en la especie *Th.h piperella* L. tanto en la planta *wild type* como en las micropropagadas *in vitro* (tratamientos M7 Y M0). En ella podemos observar la elicitación del compuesto timol y acetato de timol en las plantas micropropagadas con respecto a la planta *wild type*.

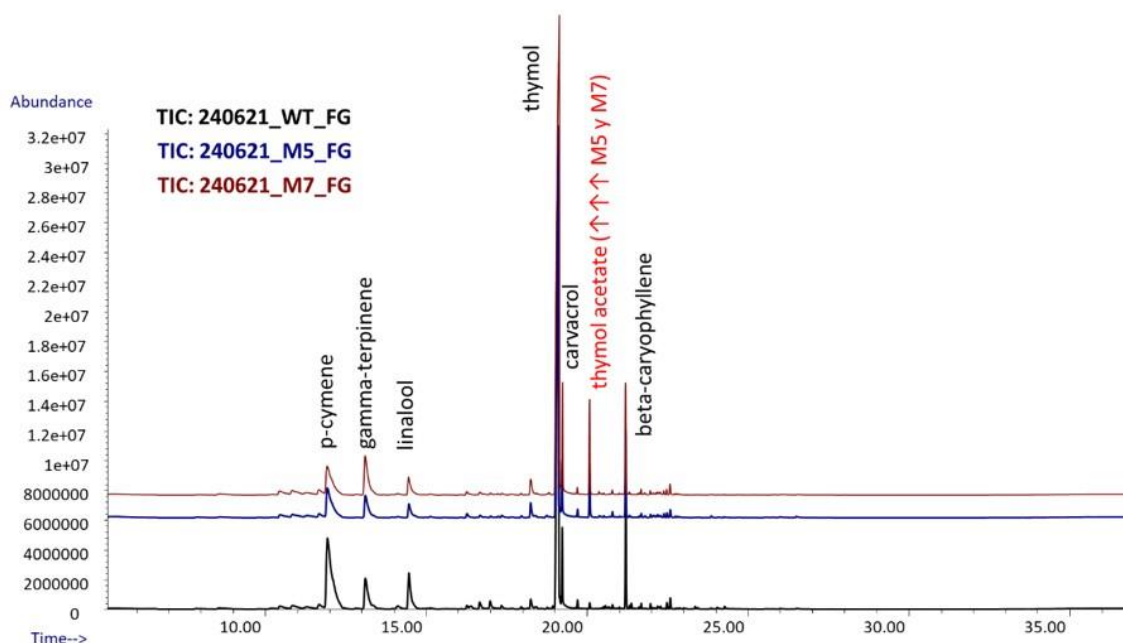


Figura 21: Cromatogramas obtenidos mediante el análisis HS-SPME-GC-MS. En negro se muestra los resultados de la planta *wild type*, en azul se muestran los resultados del tratamiento M5 y en rojo los resultados del tratamiento M7. Los cromatogramas se encuentran desplazados para poder apreciar las diferencias en los perfiles cromatográficos.

Los resultados de este estudio muestran que los componentes que se encuentran en mayor proporción son: para-cimeno (22,33% - 12,09% - 8,12%) y timol (44,91% - 55,00% - 60,52%) para WT, M0 y M7 respectivamente.

## 5. DISCUSIÓN

### **Esterilización e inicio del cultivo *in vitro***

Los resultados del experimento de esterilización e inicio (Tabla 3) mostraron que tanto el tratamiento 2 (Etanol 70% durante 30 segundos e hipoclorito sódico, 40 g/l, 15%, 15 minutos) como el tratamiento 1 (Etanol 70% durante 30 segundos e hipoclorito sódico, 40 g/l, 7%, 20 minutos) son efectivos en la prevención de la contaminación total, ya que no mostraron diferencias significativas entre sí. Aunque el tratamiento 1 ( $5,19 \pm 22,33$ ) mostró menos contaminación total que el tratamiento 2 ( $13,51 \pm 34,66$ ), La contaminación fúngica y bacteriana pueden originarse en el entorno de laboratorio, las técnicas de laboratorio, el manejo, ácaros (*Acarí* Leach) y trips (Thysanoptera) (Dangariya, Khandhar, Monpara, Chudasama, y Thaker, 2020). La contaminación (bacterias y hongos) que se da lugar en el cultivo *in vitro* también puede ser debido a que hay microorganismos de manera endógena (Schulz y Boyle, 2006) que pueden ser detectados en cualquier momento en tejido vegetal asintomático. También pueden ser epifíticos (que se sitúan o viven sobre la planta), saprófitos, pueden o no causar patogenicidad (Dangariya et al., 2020).

Lo que sugirió la hipótesis de que el tratamiento 2 pudiera causar la liberación de bacterias endógenas, esto puede ser debido a que el hipoclorito sódico en una concentración superior al tratamiento 1 haya causado algún tipo de estrés en el tejido vegetal. La explicación se podría encontrar en que las bacterias endófitas se acumulan en diferentes tejidos y compartimentos de la planta como pueden ser: los espacios intercelulares de las paredes celulares, los vasos del xilema y el apoplasto (Perez, Chamorro, Leonardo. 2013). De esta manera, el número de nodos inferior respecto al tratamiento 1 podría ser explicado por letargo (estado de adormecimiento e inactividad) causado por estrés en respuesta al tratamiento 2. Lo que podría ser interesante de llevar a estudio en futuras investigaciones y, a la vez interesante ya que la contaminación incrementa la tasa de mortalidad, implica un crecimiento variable, la reducción de la multiplicación de brotes y reducción del enraizamiento (Varghese y Joy, 2016).

El estado de etiolación es definido como la aparición de plastos con ausencia de color (etioplastos) en tejidos que presentan cloroplastos en condiciones de ausencia lumínica. (Armarego-Marriott, Sandoval-Ibañez y Kowalewska 2020). La etiolación observada tras los primeros diez días de cultivo *in vitro* prácticamente se vio revertida con la

transferencia a fotoperiodo de 16 horas (Figura 16, F). Muy probablemente, la causa se debe a que ocurre el fenómeno de des-etiolación, la transición de etioplastos a cloroplastos y se puede explicar con la posterior por la nueva exposición de la planta a la luz ya que también implica la activación del sistema fotosintético mediante un cambio fotomorfogénico a nivel de plántula (Armarego-Marriott et al., 2019).

### **Multiplicación**

De forma general, la multiplicación resultó ser más efectiva con el tratamiento M7 (medio suplementado con 2iP a una concentración de 0,013 mg/l), tal y como se expone en la Tabla 1. En anteriores trabajos del género *Thymus* como es el caso de *Th. vulgaris* (El Ansari et al., 2019) el regulador del crecimiento más destacado también fue 2iP a una concentración de 0,29 mg/l. Del mismo modo, en un cultivar ornamental híbrido de *Th. vulgaris* el regulador más efectivo según Kulpa, Wesolowska, y Jadczak (2018) fue 2iP a una concentración de 5 mg/l. A continuación se discuten los resultados de multiplicación obtenidos para cada uno de los parámetros de desarrollo vegetal estudiados.

### **Generación de nodos y hojas**

La generación de nodos fue satisfactoria para el tratamiento M7 (0,013 mg/l de 2iP) respecto a los otros tratamientos (Tabla 6) manteniendo diferencias significativas con ellos. En *Sideritis leucantha* Cav. 2iP también fue el regulador del crecimiento más efectivo para incrementar el número de nodos a una concentración de 0,14 mg/l, a diferencia de los tratamientos realizados con otras citoquininas como BAP (Juan-Vicedo et al., 2021). En este sentido, en el trabajo previo realizado en *Th. piperella* se documentó que la adición progresiva de BAP al medio reducía drásticamente el número de nodos por brote (Sáez et al., 1994), aunque en este estudio no se realizaron comparaciones con 2iP.

### **Proliferación de brotes**

Para que el cultivo *in vitro* produzca una proliferación de brotes óptima es importante saber cuál es el balance adecuado de reguladores de crecimiento que se suplementan en el medio de cultivo (Marco-Medina y Casas, 2015). En estudios realizados con anterioridad en especies del género *Thymus*, como es en el caso de *Th. vulgaris* L., el

2iP fue el regulador del crecimiento que mejor funcionó para la multiplicación y proliferación de brotes a una concentración de 0,29 mg/l (El Ansari et al., 2019). En ejemplares silvestres de *Th. piperella* el medio más efectivo para la proliferación de brotes resultó ser el formulado con 0,57 mg/l AIA + 1,48 mg/l BAP (Sáez et al., 1994). En *Th. vulgaris* L. según Kulpa et al. (2018) la adición de 5 mg/l de 2iP fue la concentración de regulador más efectiva para la fase de multiplicación. En *Th. quinquecostatus* Celak. (Keum-Young Lee, 2004), 2iP fue el regulador más efectivo a una concentración de 2 mg/l.

En este estudio el tratamiento que mejor respondió para la generación de hojas fue el tratamiento M7, el cual contenía un volumen inferior de regulador del crecimiento respecto a los otros tratamientos con regulador (0,013 mg/l de 2iP, como se expone en la (Tabla 6). Sin embargo, no mostró diferencias significativas con el tratamiento M0, totalmente desprovisto de reguladores del crecimiento exógenos. Los otros tratamientos generaron un número significativamente menor de hojas, excepto el tratamiento M1 (Tabla 6). En otros trabajos el número de hojas se vio incluso reducido con la presencia de reguladores del crecimiento, siendo el medio basal MS desprovisto de reguladores del crecimiento el que mejores resultados proporcionó en la multiplicación *in vitro* de *Th. moroderi* (Marco-Medina y Casas, 2015).

### **Elongación**

En lo referido a elongación de las plántulas formadas en cultivo *in vitro* los tratamientos que mejor respondieron fueron M7 (suplementado con 2iP a una concentración de 0,013 mg/l) y M0 (Desprovisto de reguladores del crecimiento) (Tabla 6). Aunque no mostraron diferencias significativas con tratamientos como el M8 (Suplementado con 2iP a una concentración de 0,069 mg/l), M9 (Suplementado con 2iP a una concentración de 0,14 mg/l) y M10 (suplementado con 2iP a una concentración de 0,7 mg/l). En recientes estudios desarrollados en otras especies de labiadas, el medio que mejor resultó para la elongación de brotes fue el 2iP (0,14 mg/l) en *S. leucantha* Cav. (Juan-Vicedo et al., 2021), mientras que según Marco-Medina y Casas (2015) el tratamiento sin regulador de crecimiento fue el que mejores resultados mostró para *Th. moroderi* lo que sugiere una sensibilidad específica del genotipo de la especie o cultivar y los reguladores del crecimiento aportados de forma exógena.

La BAP suele ser el regulador de elección, pero las labiadas son muy sensibles a la adición de reguladores exógenos tal y como se muestra en trabajos como el de *Th. moroderi* de Marco-Medina y Casas, (2015) y *Sideritis leucantha* (Juan-Vicedo, et al., 2021) y, en definitiva, reguladores que son “menos potentes” funcionan bien para el desarrollo vegetal *in vitro* de estas especies porque se obtienen mejores parámetros de desarrollo vegetal (como la elongación) y un menor número de malformaciones o anomalías morfológicas.

En este estudio se dio el caso de que el tratamiento M2, (Suplementado con BAP a una concentración de 1,48 mg/l y con AIA a una concentración de 0,57 mg/l) el medio óptimo según Sáez et al., (1994) generó callo (Figura 19). Suele generarse en condiciones en las que los reguladores de crecimiento (auxinas y citoquininas) se encuentran en una proporción similar (Dogan, 2019; Malik et al., 2021). En este caso, las proporciones no eran del todo similares, podría atribuirse una cierta sensibilidad a este genotipo tras la adición combinada de auxinas y citoquininas, que acaba en formación de callo.

### **Enraizamiento**

En este estudio, las raíces se generaron de forma espontánea en el tratamiento M0 (desprovisto de reguladores del crecimiento) al igual que en *Th. moroderi* (Marco-Medina y Casas, 2015). En el presente trabajo, no muestra diferencias significativas con el tratamiento M7. En anteriores estudios se reportó que el mejor medio para la generación de raíces es el MS sin la adición de ninguna clase de regulador del crecimiento (Nordine, Tlemcani, y El Meskaoui, 2014). En el caso del experimento de Sáez et al. (1994) el aumento progresivo de citoquininas inhibía el crecimiento radicular, del mismo modo que en este estudio.

### **Caracterización química preliminar de los compuestos volátiles presentes en el material vegetal en cultivo *in vitro* de *Th. piperella***

Las condiciones del cultivo *in vitro* pueden modificar la producción de metabolitos secundarios en las células y tejidos vegetales (Bekircan, Yaşar, Yıldırım, Sökmen y Sökmen, 2018; Gonçalves y Romano, 2013; Hussain et al., 2012). En este estudio se observa que los tratamientos M0 (sin reguladores) y M7 (Suplementado con 2iP a una concentración de 0,013 mg/l) aumentan la producción de dos compuestos (timol y acetato de timol) con respecto a las muestras del *wild type*. En anteriores estudios del género *Thymus*, como es el caso de *Th. leucotrichus* Hal., se incrementó la producción

de timol en medio de cultivo suplementado con 1 mg/l de kinetina, y también de carvacrol con 0,1 mg/l de tidiázurón.

En recientes estudios, se ha documentado que la adición de 150 mg/l de triptófano en el medio de cultivo aumentó la producción de timol en un 390% (Al-Jibouri, Abed, Abass Ali, y Majeed, 2016). En *Th. vulgaris* L. la adición de 0,20 mg/l de AIA al medio MS supuso el incremento de timol en un 315% (Affonso, Bizzo, Lage, y Sato, 2009).

Los resultados del análisis químico realizado en el presente trabajo apoyan la identidad taxonómica adscrita al ejemplar comercial de uso tradicional sujeto a estudio, circunscrito como un híbrido de *Th. piperella* por sus caracteres morfológicos. Además, por el perfil en compuestos volátiles obtenido en este estudio se podría incluir dentro del quimiotipo B descrito por Ruiz-Navajas et al. (2012), ya que los componentes que se encuentran en mayor porcentaje de área son el timol y el para-cimeno. Finalmente, se puede ver un aumento destacable de la proporción de timol en las plántulas cultivadas *in vitro* (especialmente en las plántulas cultivadas en medio M7, con 2iP a una concentración de 0,013 mg/l) lo que sugiere que las condiciones de cultivo *in vitro* pueden elicitar la biosíntesis de este metabolito de interés, tal y como se ha documentado para otras especies (Affonso, Bizzo, Lage, y Sato, 2009; Al-Jibouri, Abed, Abass Ali, y Majeed, 2016). Sin embargo, la falta de más réplicas técnicas en el análisis hace que esta idea deba tomarse con precaución. Por ello, sería interesante profundizar posteriormente en el papel de los sistemas de cultivo de *in vitro* en la elicitación de este compuesto (u otros con interés medicinal o alimentario tales como el carvacrol) en este híbrido comercial de *Th. piperella* o en alguno de los quimiotipos de la especie silvestre, así como determinar si la posterior transferencia a condiciones *ex vitro* del material micropropagado (aclimatación) permite mantener niveles de estos compuestos por encima de los encontrados en especímenes silvestres, no sujetos a cultivo *in vitro*.



## 6. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente Trabajo Fin de Grado, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- En la esterilización del material vegetal sometido a estudio, tanto el tratamiento 1 (hipoclorito sódico, 40 g/l, 7%, durante 20 minutos) como el tratamiento 2 (hipoclorito sódico, 40 g/l, 15%, durante 15 minutos) fueron efectivos en el inicio del cultivo *in vitro* atendiendo a los niveles de contaminación total y restauración del crecimiento obtenidos tras ambos.
- Para la multiplicación, los tratamientos M0 (medio basal, sin reguladores del crecimiento) y M7 (medio basal, suplementado con 0,013 mg/l de 2iP) mostraron valores óptimos (mayores) de desarrollo vegetal en términos de número de nuevos brotes, nodos y hojas formados, así como de elongación y enraizamiento de las plántulas cultivadas *in vitro*, en comparación con el resto de medios de cultivo estudiados.
- El análisis de compuestos volátiles realizado en las tres muestras de este estudio (*wild type* y plántulas cultivadas en los tratamientos M0 y M7) sugieren que este material comercial puede adscribirse al quimiotipo B de *Th. piperella*, descrito anteriormente, por su mayor contenido en timol y para-cimeno.
- Finalmente, los tratamientos M0 y, especialmente, M7 de este espécimen parecen incrementar la biosíntesis de timol, por lo que líneas futuras de investigación podrían ir encaminadas en determinar con mayor precisión el papel de la elicitación de este compuesto en condiciones de cultivo *in vitro*.

## 7. BIBLIOGRAFÍA Y WEBGRAFÍA

### **Webgrafía**

Ana Pelacho, R. (2021) [Imágenes]. T7: Preparación, iniciación y aclimatación. 2 June 2021, Recuperado de <http://cv.udl.cat/cursos/76304/t7/t7.htm>

Galvez, F. (n.d.). *Flora Vascular - Toda la información detallada sobre la Flora Vascular* | - *Especie: Thymus piperella* | *BioScripts.net*. 22 Abril, 2021, Recuperado de [https://www.floravascular.com/index.php?spp=Thymus piperella](https://www.floravascular.com/index.php?spp=Thymus+piperella)

Thymus piperella. (2021) [imagen]. 20 Abril 2021, Recuperada de <http://www.floraprotegida.es/flora-vulnerable.php/Thymus-piperella-123/>

Universidad de Murcia. (2021.). *Thymus piperella*. 23 Mayo, 2021, Recuperado de <http://www.floraprotegida.es/flora-vulnerable.php/Thymus-piperella-123/>

## **Bibliografía**

Adzet Porredón, T., y Passet, J. (1976). Estudio quimiotaxonomico del *Thymus piperella* L. *Collectanea Botanica*, 1976, vol. X, num. 1, p. 5-11.

Affonso, V. R., Bizzo, H. R., Lage, C. L. S., y Sato, A. (2009). Influence of growth regulators in biomass production and volatile profile of in vitro plantlets of *Thymus vulgaris* L. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(14), 6392-6395.

Afzal Malik, W., Mahmood, I., Razzaq, A., Afzal, M., Abbas Shah, G., Iqbal, A., Zain, M., Ditta, A., Ahmed Asad, S., Ahmad, I., Mangi, N., y Ye, W. (2021). *Exploring potential of copper and silver nano particles to establish efficient callogenesis and regeneration system for wheat (Triticum aestivum L.)*. <https://doi.org/10.1080/21645698.2021.1917975>

Al-Jibouri, A. M., S. Abed, A., Abass Ali, A. J., y Majeed, D. M. (2016). Improvement of Phenols Production by Amino Acids in Callus Cultures of *Verbascum thapsus* L. *American Journal of Plant Sciences*, 07(01), 84–91. <https://doi.org/10.4236/ajps.2016.71010>

Anwar Shahzad, Shiwalí Sharma, Shahina Parveen, Taiba Saeed, Arjumend Shaheern, Rakhshanda Akhtar, Vikas Yadav, Anamica Upadhyay, y Zisham Ahmad. (2017). Plant biotechnology: Principles and applications. *Plant Biotechnology: Principles and Applications*, 1–36. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-2961-5>

Armarego-Marriott, T., Kowalewska, Ł., Burgos, A., Fischer, A., Thiele, W., Erban, A., Strand, D., Kahlau, S., Hertle, A., Kopka, J., Walther, D., Reich, Z., Schöttler, M. A., y Bock, R. (2019). Highly resolved systems biology to dissect the etioplast-to-chloroplast transition in tobacco leaves. *Plant Physiology*, 180(1), 654–681. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01432>

Armarego-Marriott, T., Sandoval-Ibañez, O., y Kowalewska, Ł. (2020). Beyond the darkness: Recent lessons from etiolation and de-etiolation studies. *Journal of Experimental Botany*, 71(4), 1215–1225. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz496>

Ballester Costa, C. (2016). *Composición química y propiedades antibacterianas y*

*antioxidantes de aceites esenciales de especies de thymus procedentes de cultivo ecológico y su aplicación a películas de quitosano.* (tesis) Recuperada de url <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=64432>

Bekheet, S. (2013). Direct Organogenesis of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) for Propagation of True-to-Type Plants. *Scientia Agriculturae*, 4(3), 85–92.

Bekircan, T., Yaşar, A., Yıldırım, S., Sökmen, M., y Sökmen, A. (2018). Effect of cytokinins on in vitro multiplication, volatiles composition and rosmarinic acid content of *Thymus leucotrichus* Hal. shoots. 3 *Biotech*, 8(3), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1206-2>

Cassanova, A. Zaragoza, B. Belda, I. Martinez, J.E. y Sev, E. (2013). Traditional Knowledge of Medicinal Plants in the Sierra de Mariola Natural Park, South-Eastern Spain. *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952., 10, 299–309.

Casanova-Sáez, R., Mateo-Bonmatí, E., y Ljung, K. (2021). Auxin metabolism in plants. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 11(3), 1–23. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a039867>

Castroviejo, S. (coord. gen. ). (1986-2012.). *Flora Iberica*, 1–8, 10–15, 17-18, 21. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.

Dangariya, M., Khandhar, D., Monpara, J., Chudasama, K., y Thaker, V. (2020). Detection and identification of microbial contaminants from plant tissue culture. *Tropical Plant Research*, 7(2), 388–395. <https://doi.org/10.22271/tpr.2020.v7.i2.045>

Dogan, M. (2019). Multiple shoot regeneration via indirect organogenesis from shoot tip and nodal meristem explants of *Ceratophyllum demersum* L. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 29(2), 568–577.

El Ansari, Z. N., Boussaoudi, I., Benkaddour, R., Hamdoun, O., Lemrini, M., Martin, P., Badoc, A., y Lamarti, A. (2020). Conservation of *Thymus pallidus* Cosson ex Batt. By shoot tip and axillary bud in vitro culture. *Journal of Plant Biotechnology*, 47(1), 53–65. <https://doi.org/10.5010/JPB.2020.47.1.053>

El Ansari, Z. N., El Mihyaoui, A., Boussaoudi, I., Benkaddour, R., Hamdoun, O., Tahiri,

H., Badoc, A., El Oualkadi, A., y Lamarti, A. (2019). Effect of Macronutrients, Cytokinins and Auxins, on n Vitro Organogenesis of *Thymus vulgaris* L. *American Journal of Plant Sciences*, 10(09), 1482–1502. <https://doi.org/10.4236/ajps.2019.109105>

Fernanda Leal, Meriem Taghoutti, Fernando Nunes, Amélia Silva, Ana Claudia Coelho y Manuela Matos (2017). Thymus Plants: A Review-Micropropagation Molecular and Antifungal Activity. *Intech*, 7, 13. <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>

Ferrer-Gallego, P. P., Peris, A. N., Rovira, P. P., y Lumbreras, E. L. (2019). Dos Nuevos Híbridos en el Género *Thymus* L. (Lamiaceae). *Flora Monteiberica* 75, 23, 15–23. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.

Gautheret, R. J. (1939). Sur la possibilité de realiser la culture indefinie des tissus de tubercules de carotte. *CR Hebd, Seances Acad. Sc*, 208, 118–120.

Gonçalves, S., y Romano, A. (2013). In vitro culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 31(2), 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.09.006>

Guesmi, F., Saidi, I., y Landoulsi, A. (2020). *The species Thymus hirtus Willd.ssp. algeriensis (Boiss . and Reut.) Murb: Ethnobotanical description , ontogenesis , phenology and phytopharmacological uses – A review*. 93, 184–193.

Gupta, N., Jain, V., Joseph, M. R., y Devi, S. (2020). A Review on Micropropagation Culture Method. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 8(1), 86–93. <https://doi.org/10.22270/ajprd.v8i1.653>

Haberlandt, G. (1902). Cellular totipotency. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*, 71–90.

Homaidan Shmeit, Y., Fernandez, E., Novy, P., Kloucek, P., Orosz, M., y Kokoska, L. (2020). Autopolyploidy effect on morphological variation and essential oil content in *Thymus vulgaris* L. *Scientia Horticulturae*, 263(November 2019), 109095. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109095>

Hussain, M. S., Fareed, S., Ansari, S., Rahman, M. A., Ahmad, I. Z., y Saeed, M. (2012).

Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 4(1), 10–20. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.92725>

Imada, E. L., Rolla dos Santos, A. A. de P., Oliveira, A. L. M. de, Hungria, M., y Rodrigues, E. P. (2017). Indole-3-acetic acid production via the indole-3-pyruvate pathway by plant growth promoter *Rhizobium tropici* CIAT 899 is strongly inhibited by ammonium. *Research in Microbiology*, 168(3), 283–292. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.10.010>

Juan-Vicedo, J., Ramírez-Luna, J. E., Piqueras, A., y Casas, J. L. (2021). Micropropagation and cryopreservation by vitrification of the Spanish endemic medicinal plant *Sideritis leucantha* Cav. subsp. *leucantha* (Lamiaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, Allen 2014. <https://doi.org/10.1007/s11627-021-10173-5>

Kaeppler, S. M., Kaeppler, H. F., y Rhee, Y. (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology*, 43(2–3), 179–188. <https://doi.org/10.1023/a:1006423110134>

Keum-Young Lee, H. D. K. (2004). *Influence of Plant Growth Regulators on Shoot Multiplication of Thymus quinquecostatus Celak.* 31(No. 1), 37–41.

Khajuria, A. K., Bisht, N., y Bhagat, N. (2020). In vitro organogenesis and plant regeneration of *Thymus serpyllum* L.: an important aromatic medicinal plant. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 56(5), 652–661. <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10094-9>

Kharrazi, M., Tehranifar, A., Nemati, S., Bagheri, A., y Sharifi Sharif Abad, A. (2011). In Vitro Culture of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) Focusing on the Problem of Vitrification. *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 5(13), 1–6.

Kieber, J. J., y Schaller, G. E. (2018). Cytokinin signaling in plant development. *Development (Cambridge, England)*, 145(4), 1–7. <https://doi.org/10.1242/dev.149344>

Kosakowska, O., Bączek, K., Przybył, J. L., Pawełczak, A., Rolewska, K., y Węglarz, Z. (2020). Morphological and chemical traits as quality determinants of common thyme (*Thymus vulgaris* L.), on the example of ‘Standard Winter’ cultivar. *Agronomy*, 10(6), 1–

14. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060909>

Kubiasová, K., Montesinos, J. C., Šamajová, O., Nisler, J., Mik, V., Semerádová, H., Plíhalová, L., Novák, O., Marhavý, P., Cavallari, N., Zalabák, D., Berka, K., Doležal, K., Galuszka, P., Šamaj, J., Strnad, M., Benková, E., Plíhal, O., y Spíchal, L. (2020). Cytokinin fluoroprobe reveals multiple sites of cytokinin perception at plasma membrane and endoplasmic reticulum. *Nature Communications*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17949-0>

Kulpa, D., Wesolowska, A., y Jadczyk, P. (2018). Micropropagation and composition of essentials oils in garden thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 46(2), 525–532. <https://doi.org/10.15835/nbha46211020>

Labib, G. S., y Aldawsari, H. (2015). Innovation of natural essential oil-loaded Orabase for local treatment of oral candidiasis. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 3349–3359. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S85356>

Liu, S., Zhao, J., Liu, Y., Li, N., Wang, Z., Wang, X., y Li, L. (2021). High Chromosomal Stability and Immortalized Totipotency Characterize Long-Term Tissue Cultures of Chinese Ginseng (*Panax Ginseng*). *Genes*, 12(4), 514.

Lumbreras, E. L., y Ferrer-gallego, P. P. (2018). *Aplicación de Índices de Diversidad Fitosociológica a la Serie de Vegetación del Encinar Mesomediterráneo Valenciano*. 2, 145–156.

Lv, B., Yan, Z., Tian, H., Zhang, X., y Ding, Z. (2019). Local Auxin Biosynthesis Mediates Plant Growth and Development. *Trends in Plant Science*, 24(1), 6–9. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.10.014>

Mansanet, J., Mateu, I., Mansanet, J., Aguilera, A., y Maten, I. (1985). *Dos especies híbridas nuevas: Thymus x Josephi Angeli J. Mansanet y A. Aguilera y Helianthemum x carmen joanae J. Mansanet y I. Mateu*. 83–88.

Marco-Medina, A., y Casas, J. L. (2015). In vitro multiplication and essential oil composition of *Thymus moroderi* Pau ex Martínez, an endemic Spanish plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 120(1), 99–108. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0583-4>

Mateo Sanz, G., y Crespo Villalba, M. B. (2014). Novedades taxonómicas y nomenclaturales para la flora Valenciana, III. Colección Monografías de *Flora Montiberica*, nº 6, Encuadernación rústica cosida, 17 x 24 cm, 503 páginas con ilustraciones en B/N. Edita: Joluble Consultor Botánico y editor. ISBN papel: 978-84-941996-7-7. ISBN ebook: 978-84-943561-4-8.

Kane, M. E. (2011). Propagation by shoot culture. *Plant tissue culture, development and biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, FL, 181-191.

Mideros Mora, C. (2021). *Bases moleculares de la especificidad en el mecanismo de transducción de señal en los sistemas de dos componentes bacterianos*.

Miguel Jordan y José Casaretto. (2011). Fisiología Vegetal. In Squeo y Cardemil (Ed.), *Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Citoquininas y Giberelinas*. (Universida, Vol. 84, Issue 4). <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.84.042335>

Mokhtarzadeh, S., Demirci, B., Ağalar, H. G., Khawar, K. M., y Kırimer, N. (2019). In vitro propagation and volatile compound characterization of *Lavandula stoechas* L. subsp. *stoechas*-an economically important source of essential oil. *Records of Natural Products*, 13(2), 121–128. <https://doi.org/10.25135/rnp.86.18.04.105>

Morales, R., Tardío, J., Aceituno, L., Molina, M., y Pardo-De-Santayana, M. (2011). Biodiversidad y Etnobotánica en España Biodiversity and Ethnobotany in Spain. 1. *Real Jardín Botánico, CSIC. Plaza de Murillo, 2. E-28014-Madrid. España. Morales@rjb.Csic.Es* 2. *Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA). Finca “El Encín”. Apdo. 127. E-28800 Alcalá de Henares. España* 3. D, 157–207. <http://147.96.59.157/rsehn/cont/publis/boletines/130.pdf>

Morales Valverde, R. (1995). Híbridos de *Thymus* L. (Labiatae) en la Península Ibérica. *Anales Del Jardín Botánico de Madrid*, 53(2), 199–211.

Murashige, T., y Skoog, F. (1962). Murashige1962Revised.Pdf. *Physiologia Plantarum*, 15, 474–497.

Nobécourt, P. (1939). Sur la pérennité et l' augmentation de volume des cultures de tissus végétaux. *CR Seances Soc. Biol. Ses Fil*, 130, 1270–1271.



Nordine, A., Tlemcani, C. R., y El Meskaoui, A. (2014). Regeneration of plants through somatic embryogenesis in *Thymus hyemalis* Lange, a potential medicinal and aromatic plant. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 50(1), 19–25. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9577-x>

Pasternak, T., Lystvan, K., Betekhtin, A., y Hasterok, R. (2020). From single cell to plants: Mesophyll protoplasts as a versatile system for investigating plant cell reprogramming. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms21124195>

Perez, C., Dr., Chamorro, A. Leonardo. (2013). *Bacterias Endofitas: Un Nuevo Campo de Investigación para el Desarrollo del Sector Agropecuario*. 5 (2), 439–462.

Peris Gisbert, J. B. (2013). Etnobotánica farmacológica valenciana. *Anales Reial Acadèmia de Medicina de La Comunitat Valenciana*, 14, 1–22.

Potter, K. C., Wang, J., Schaller, G. E., y Kieber, J. J. (2018). Cytokinin modulates context-dependent chromatin accessibility through the type-B response regulators. *Nature Plants*, 4(12), 1102–1111. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0290-y>

R., Esra, S., y Qauod, H. A. (2017). Introducing some of threatened thymus species to in Vitro tissue culturing as an approach for their conservation. *Pakistan Journal of Botany*, 49(1), 259–264.

Ramírez-Mosqueda, M. A., y Iglesias-Andreu, L. G. (2015). Indirect organogenesis and assessment of somaclonal variation in plantlets of *Vanilla planifolia* Jacks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 123(3), 657–664. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0868-2>

Rivera, D., Alcaraz, F., Verde, A., Fajardo, J., y Obón, C. (2008). *Las plantas en la cultura popular. Enciclopedia divulgativa de la historia natural de Jumilla-Yecla*.

Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Barber, X., Sendra, E., Perez-Alvarez, J. A., y Fernández-López, J. (2015). Effect of chitosan edible films added with *Thymus moroderi* and *Thymus piperella* essential oil on shelf-life of cooked cured ham. *Journal of Food Science and Technology*, 52(10), 6493–6501. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1733-3>

Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Sendra, E., Perez-Alvarez, J. A., y Fernández-López, J. (2012). Chemical characterization and antibacterial activity of *Thymus moroderi* and *Thymus piperella* essential oils, two *Thymus* endemic species from southeast of Spain. *Food Control*, 27(2), 294–299. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.04.005>

Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Sendra, E., Perez-Alvarez, J. A., y Fernández-López, J. (2013). In vitro antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with *Thymus moroderi* or *Thymus piperella* essential oils. *Food Control*, 30(2), 386–392. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.07.052>

Sáez, F., Sánchez, P., y Piqueras, A. (1994). Micropropagation of *Thymus piperella*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39(3), 269–272. <https://doi.org/10.1007/BF00035981>

Sant Saran Bhojwani y Prem Kumar Dantu. (2013). *Plant Tissue Culture: An Introductory Text* (1ª ed.) Springer New Delhi Heidelberg New York Dordrecht London.

Saravanan, S., Sarvesan, R., y Vinod, M. S. (2011). Identification of DNA elements involved in somaclonal variants of *Rauvolfia Serpentina* (L.) arising from indirect organogenesis as evaluated by ISSR analysis. *Indian Journal of Science and Technology*, 4(10), 1241–1245. <https://doi.org/10.17485/ijst/2011/v4i10/30164>

Schulz, B., y Boyle, C. (2006). *What are Endophytes?* 9, Microbial Root Endophytes, 1–13. doi:10.1007/3-540-33526-9\_1

Sharma, A. K., Sharma, M., Jain, M., Arora, K., Rai, S. K., y Purshottam, D. K. (2016). Plant Tissue Culture Approach for Cloning and Conservation of Some Important RET Medicinal Plants. In *Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement* (pp. 199-217). Springer, Singapore.

Tamimi, S. M., y Othman, H. (2021). Callus induction and regeneration from germinating mature embryos of wheat (*triticum aestivum* L.). *Sains Malaysiana*, 50(4), 889–896. <https://doi.org/10.17576/jsm-2021-5004-01>

Teale, W. D., Paponov, I. A., y Palme, K. (2006). Auxin in action: Signalling, transport

and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(11), 847–859. <https://doi.org/10.1038/nrm2020>

Tsoktouridis, G., Krigas, N., Sarropoulou, V., Kampouroulou, S., Papanastasi, K., Grigoriadou, K., Menexes, G., y Maloupa, E. (2019). Micropropagation and molecular characterization of *Thymus sibthorpii* Benth. (Lamiaceae), an aromatic-medicinal thyme with ornamental value and conservation concern. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 55(6), 647–658. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-10000-y>

Varghese, N., y Joy, P. P. (2016). *Plant Tissue Culture Contaminants Identification. January*

Veilleux y Johnson. (1998). Somaclonal variation: molecular analysis, transformation interaction, and utilization. *Plant Breeding Reviews*, 16, 229–268.

Verma, V., Zinta, G., y Kanwar, K. (2021). Optimization of efficient direct organogenesis protocol for *Punica granatum* L. cv. Kandhari Kabuli from mature leaf explants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 57(1), 48–59. <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10111-x>

Villalobos, V. M., y Thorpe, T. A. (1991). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura*, 127-141.

White, P. R. (1939). Potentially Unlimited Growth of Excised Plant Callus in an Artificial Nutrient. *American Journal of Botany*, 26 (2), 59–64. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1939.tb12867.x>

Woldeyes, G. G., Senbeta, T. F., Adugna, A. Y., y Abegaz, A. W. (2021). *The Effect of MS strength, pH and Sucrose Concentrations on In vitro Propagation of Okra (A belmoschus esculentus L.) from Shoot Tip Explants.* 1–17. <https://www.researchsquare.com/article/rs-153475/latest.pdf>

Yadav, A., Kothari, S. L., Kachhwaha, S., y Joshi, A. (2019). In vitro propagation of chia (*Salvia hispanica* L.) and assessment of genetic fidelity using random amplified polymorphic DNA and intersimple sequence repeat molecular markers. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 7(1), 42–47. <https://doi.org/10.7324/JABB.2019.70108>

